

FERNANDA ROSALINSKI MORAES

**USO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS NA AVALIAÇÃO  
DA RESPOSTA IMUNE DOS OVINOS À INFECÇÃO  
NATURAL POR NEMATÓDEOS E NA SELEÇÃO  
DE ANIMAIS RESISTENTES ÀS PARASITOSE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia Animal.

Orientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol - UFPR

Co-orientadores:

Prof. Dr. Paulo Rossi Júnior - UFPR

NZCS Richard J. Shaw - AgResearch  
Wallaceville, Nova Zelândia

CURITIBA

2002



## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área Patologia Veterinária **FERNANDA ROSALINSKI MORAES** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada **“Uso de Marcadores Imunológicos na Avaliação da Resposta Imune dos Ovinos à Infecção Natural por Nematódeos e na Seleção de Animais Resistentes às Parasitoses”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidato se houve muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito **"A"** concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 07 de maio de 2002.

Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL  
Presidente/Orientador

Prof. Dr. JOSÉ LUCIANO ANDRIGUETTO  
Membro

Profa. Dra. CRISTIANE OTTO DE SÁ  
Membro

## AGRADECIMENTOS

À professora Vanete Thomaz Soccol, não apenas pela devotada orientação em todos os momentos deste trabalho, mas também pelo exemplo de competência e amor à pesquisa.

Ao professor Paulo Rossi Júnior, co-orientador deste trabalho, por suas valiosas críticas e sugestões, bem como o auxílio para condução das práticas na Fazenda Experimental do Canguiri.

*To Mr. Richard Shaw, from AgResearch - Wallaceville Research Centre, for sharing the IgE methods, supplying the IgE mAbs and also for the suggestions to this study.*

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, na pessoa de seu coordenador Luiz Ernandes Kozicki, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional e científico.

A Francisco Gerber, secretário do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, por sua atenção e disponibilidade, que criaram condições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Ao Tenente Mário Barbosa, do Quartel General da V Região Militar em Curitiba, pela cessão dos ovinos e apoio na realização deste trabalho.

Aos soldados Reinaldo José dos Santos, José Ananias Carneiro e Alexandre Trindade, do Quartel General da V Região Militar em Curitiba, pelo cuidado no manejo dos animais e a ajuda na realização das coletas de material.

Ao professor Luiz Mário Fedalto, diretor da Fazenda Experimental do Canguiri, por possibilitar o abate dos animais utilizados para a obtenção do antígeno.

Ao Sr. Abílio Costa Farias, funcionário do setor de Ovinocultura da Fazenda Experimental do Canguiri, pela dedicação no manejo dos ovinos durante o período de infecção experimental e obtenção de soros-controle.

À professora Rosângela Locatelli Dittrich e à tecnologista Nara Schimanski, pelo uso do Laboratório de Patologia Clínica da UFPR e auxílio na realização dos exames hematológicos.

*To Mrs. Margaret McNeill, for the assistance during the IgE assays, as well as her friendship and hospitality.*

Ao professor Doutor José Domingos Fontana, do Departamento de Bioquímica da UFPR, pela utilização do sonicador para obtenção do antígeno.

Ao SIMEPAR, por fornecer os dados meteorológicos do período experimental.

À professora Doutora Edilene Alcântara de Castro e ao doutorando João Carlos Minozzo, cujo auxílio técnico e sugestões possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

A Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt Popazoglo, pela participação na coleta de material, análises laboratoriais, bem como pelas sugestões a este estudo.

A Cristina Sotomaior, pela amizade, incentivo e sugestões na execução deste trabalho.

A Juliana Tracz Pereira e Luciane Henning, tecnologistas do Laboratório de Parasitologia Animal, pelo suporte laboratorial em todas as fases de execução deste experimento, além de sua amizade e companhia.

A Flávia de Mello Wolff, bolsista PIBIC/CNPq, Vanessa Piccolo de Oliveira e Gisela Geraldine Castilho, estagiárias do laboratório de Parasitologia Animal, por sua companhia, ajuda e dedicação nos exames coproparasitológicos, no controle parasitário dos animais e obtenção dos soros-controle.

A Cibeli Túlio de Souza, Marise Andri, Geraldo Perazolli e Wanize Bonk, acadêmicos de Medicina Veterinária, pela ajuda na coleta de material e análises laboratoriais.



A Fábio Gouveia, Maurício Oikawa e Maria da Graça Schwartz, acadêmicos de Medicina Veterinária, pelo auxílio no trabalho de campo realizado na Fazenda Experimental do Canguiri.

A Roberto Montanhini Neto pelo auxílio na análise estatística.

*To Dr. Stewart Bisset and Dr. Alex Vlassoff for the suggestions not only for this study, but also for future research.*

À mestranda Daniela Pedrassani, pela amizade, colaboração e sugestões na condução deste trabalho.

A todos os doutorandos, mestrandos, bolsistas e estagiários do laboratório de Parasitologia Animal da UFPR, pela amizade, paciência e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A Viviane Milczewski, Elza Maria Galvão Ciffoni e Felipe Pohl de Souza, pela amizade e incentivo na execução deste trabalho.

A Viviane Luczyzyn, Heloísa Ferreira, Patrícia Sillos, Márcia Chambuí, Joséli Büchele, Meibi Carneiro de Paula, Laudi Leite e Paulo Guataçara da Costa Lima, amigos e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela companhia agradável e amizade.

A meus pais, Glória Regina Rosalinski Moraes e José Moraes Neto, pelo carinho e dedicação constantes.

A minha irmã, Lígia Rosalinski Moraes, pelo auxílio na digitação deste documento.

Às ovelhas e aos cordeiros que possibilitaram este estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 PRINCIPAIS HELMINTOS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA NA OVINOCULTURA.....	7
3.1.1 Parasitos de abomaso.....	9
a) <i>Haemonchus contortus</i> (Rudolphi, 1803).....	9
b) <i>Teladorsagia</i> spp. (Andreeva e Satubaldin, 1954) e <i>Ostertagia</i> spp. (Ransom, 1907).....	10
c) <i>Trichostrongylus axei</i> (Cobbold, 1879).....	12
3.1.2 Parasitos de Intestino Delgado.....	12
a) <i>Trichostrongylus colubriformis</i> (Giles, 1892).....	12
b) <i>Nematodirus</i> spp. (Ransom, 1907).....	13
c) <i>Cooperia</i> spp. (Ransom, 1907).....	14
3.2 MECANISMOS NÃO IMUNOLÓGICOS QUE INTERFEREM COM A MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA PARASITOSE.....	15
3.3 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DE DEFESA.....	16
3.3.1 O reconhecimento antigênico.....	16
3.3.2 Mecanismos efetores.....	17

3.4 CARACTERÍSTICAS DA IMUNIDADE PARASITÁRIA.....	23
a) Rejeição das larvas de terceiro estágio (L <sub>3</sub> ).....	23
b) Retardo do desenvolvimento larvário (aumento do período pré-patente da infecção).....	24
c) Diminuição da fertilidade dos parasitos adultos (diminuição da postura de ovos e do comprimento das fêmeas parasitas).....	24
d) Expulsão de parasitos adultos ou fenômeno de auto-cura.....	25
3.5 FATORES RELACIONADOS AO HOSPEDEIRO QUE PODEM INFLUENCIAR A RESPOSTA IMUNE.....	26
3.6 EVASÃO DA RESPOSTA IMUNE POR PARTE DOS HELMINTOS.....	29
3.7 USO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS PARA A SELEÇÃO DE OVINOS GENETICAMENTE RESISTENTES À VERMINOSE GASTRINTESTINAL.....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 ANIMAIS.....	34
4.2 CONTROLE PARASITÁRIO .....	34
4.3 COLHEITA DE FEZES.....	35
4.4 COLHEITA DE SANGUE.....	35
4.5 TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS.....	36
4.6 TÉCNICAS IMUNO-HEMATOLÓGICAS.....	37
4.6.1 Contagem de eosinófilos.....	37
4.7 TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS.....	38
4.7.1 Enzima-imunoensaio indireto para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Haemonchus contortus</i> (H.c.).....	38
4.7.1.1 Obtenção do antígeno.....	38
4.7.1.2 Soros controles.....	42
a) Soros controles positivos.....	42
b) Soros controles negativos.....	42
4.7.1.3 Execução da técnica.....	43
a) Sensibilização da placa.....	45
b) Primeira lavagem.....	45
c) Bloqueio.....	45
d) Segunda lavagem.....	46

e) Adição do soro teste.....	46
f) Terceira lavagem.....	47
g) Adição do conjugado.....	47
h) Quarta lavagem.....	47
i) Adição do Substrato.....	48
j) Parada da reação.....	48
l) Leitura.....	48
4.7.2 Enzima-imunoensaio indireto para detecção de anticorpos IgE anti- <i>Haemonchus contortus</i> (H.c.).....	49
4.7.2.1 Preparo dos soros.....	49
4.7.2.2 Execução da técnica.....	49
4.7.3 Enzima-imunoensaio de captura para detecção de anticorpos IgE.....	51
4.8 CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS.....	54
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ENZIMA-IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE IgG ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> .....	59
5.1.1 Quantidade de antígeno para sensibilização da placa.....	59
5.1.2 Padronização da diluição do soro.....	61
5.1.3 Padronização da diluição do conjugado.....	63
5.1.4 Precisão da técnica de imunoensaio padronizada.....	65
5.2 CONTROLE PARASITÁRIO DOS ANIMAIS.....	66
5.3 ACOMPANHAMENTO PARASITOLÓGICO DAS OVELHAS .....	67
5.4 ACOMPANHAMENTO IMUNOLÓGICO DAS OVELHAS.....	72
5.4.1 Número de eosinófilos sanguíneos.....	72
5.4.2 Densidade óptica para pesquisa de IgG anti- <i>Haemonchus contortus</i> .....	74
5.4.3 IgE anti- <i>Haemonchus contortus</i> .....	76
5.5 ANÁLISE DE CORRELAÇÕES.....	78
5.5.1 Correlações entre eosinófilos e opg.....	78
5.5.2 Correlações entre IgG anti- <i>Haemonchus contortus</i> e opg.....	79
5.5.3 Correlações entre IgE anti- <i>Haemonchus contortus</i> e opg.....	79
5.5.4 Correlações entre eosinófilos e IgG anti- <i>Haemonchus contortus</i> .....	80
5.5.5 Correlações entre eosinófilos e IgE anti- <i>Haemonchus contortus</i> .....	80
5.5.6 Correlações entre IgG e IgE anti- <i>Haemonchus contortus</i> .....	80

5.6 SELEÇÃO DAS OVELHAS	
5.6.1 Repetibilidade dos marcadores para a seleção de ovelhas resistentes ao parasitismo.....	83
5.6.2 Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis à parasitose gastrointestinal com base no marcador parasitológico.....	85
5.6.3 Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis à parasitose gastrointestinal com base em mais de um marcador.....	89
5.6.4 Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis à parasitose gastrointestinal com base nos marcadores imunológicos.....	93
5.7 ACOMPANHAMENTO PARASITOLÓGICO DOS CORDEIROS.....	97
5.8 ACOMPANHAMENTO IMUNOLÓGICO DOS CORDEIROS.....	102
5.8.1 Contagem de eosinófilos.....	102
5.8.2 IgG anti- <i>Haemonchus contortus</i> .....	104
5.8.3 IgE anti- <i>Haemonchus contortus</i> .....	104
5.8.4 IgE total.....	104
5.9 ANÁLISE DE CORRELAÇÕES.....	108
5.9.1 Correlações entre eosinófilos e opg.....	108
5.9.2 Correlações entre opg e IgG específica.....	109
5.9.3 Correlações entre IgE e opg.....	109
5.9.4 Correlações entre IgE total e opg.....	110
5.9.5 Correlação entre eosinófilos e IgG específica.....	110
5.9.6 Correlação entre eosinófilos e IgE específica.....	110
5.9.7 Correlação entre eosinófilos e IgE total.....	110
5.9.8 Correlação entre IgE e IgG específicas.....	112
5.9.9 Correlação entre IgE total e IgG.....	112
5.9.10 Correlação entre os marcadores parasitológicos, imunológicos e a idade do animal.....	112
5.9.11 Correlação entre os marcadores parasitológicos, imunológicos e o peso do cordeiro ao nascer ou ao desmame.....	113
5.9.12 Correlação entre mães e filhos.....	114
5.10 SELEÇÃO DOS CORDEIROS.....	121
5.10.1 Repetibilidade dos marcadores para seleção de cordeiros resistentes ao parasitismo.....	121
5.10.2 Classificação dos cordeiros em resistentes e susceptíveis ao parasitismo com base no marcador parasitológico (número de ovos de helmintos por grama de fezes).....	123
5.10.3 Seleção indireta dos cordeiros em resistentes e susceptíveis ao parasitismo com base na IgE sérica total e na IgE anti- <i>Haemonchus contortus</i> .....	131
CONCLUSÃO.....	140

PERSPECTIVAS.....	143
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
APÊNDICE I - PRINCIPAIS MARCADORES CELULARES DE LINFÓCITOS.....	153
APÊNDICE II - PRINCIPAIS CITOCINAS RELEVANTES PARA A IMUNOPARASITOLOGIA.....	155
APÊNDICE III - SOLUÇÕES EMPREGADAS NAS ANÁLISES LABORATORIAIS.....	156
ANEXOS.....	161
ANEXO I - CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DO ANTÍGENO SOMÁTICO DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> (H.c.) PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976, p.248-254).....	162
ANEXO II - CONSTRUÇÃO DA CURVA LOG-LOG PARA CÁLCULO DA IgE TOTAL NAS AMOSTRAS DE SORO TESTADAS NA PLACA 01 ....	165
ANEXO III - RESULTADOS DO TESTE DE DUNCAN PARA A VARIÁVEL OPG, CONSIDERANDO APENAS O PERÍODO DE ACOMPANHAMENTO INDIVIDUAL DOS ANIMAIS.....	166
ANEXO IV - TESTE T SOBRE OS GRUPOS DE OVELHAS RESISTENTE (1) E SUSCEPTÍVEL (2) ÀS PARASITOSES.....	167
ANEXOV- HIPÓTESES PARA SELEÇÃO INDIRETA DAS OVELHAS EM RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS À PARASITOSE GASTRINTESTINAL.....	170
ANEXO VI - TESTE T SOBRE OS GRUPOS DE CORDEIROS RESISTENTE (1) E SUSCEPTÍVEL (2) ÀS PARASITOSES.....	173
ANEXO VII - COMPARAÇÃO DA MÉDIA DE OPG, EOSINÓFILOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS PELO TESTE T DE STUDENT ENTRE O GRUPO DE CORDEIROS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS.....	186

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE AS POPULAÇÕES DE CÉLULAS T AUXILIADORAS (Th).....	18
TABELA 2 - VALORES DE DENSIDADE ÓPTICA (DO) INESPECÍFICOS E ESPECÍFICOS PARA IgG ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> (H.c.) QUANDO DUAS DILUIÇÕES DE SORO SÃO ANALISADAS.....	63
TABELA 3 – PERCENTAGEM DE OVELHAS POSITIVAS PARA OVOS DE <i>MONIEZIA</i> SP. E OOCISTOS DE <i>EIMERIA</i> SPP. NO MÉTODO DE WILLIS (1927, p. 375-376), POR DATA DE COLETA.....	69
TABELA 4 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE EOSINÓFILOS CIRCULANTES DAS OVELHAS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999.....	73
TABELA 5 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE DO PARA IgG ANTI- <i>HAEMONCHUS</i> DAS OVELHAS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999.....	75
TABELA 6– MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE DO PARA IgE ANTI- <i>HAEMONCHUS</i> DAS OVELHAS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999.....	77
TABELA 7 – CORRELAÇÕES DE SPEARMAN ENTRE OPG, EOSINÓFILOS CIRCULANTES, IgG E IgE ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> DAS OVELHAS, CONSIDERANDO TODAS AS COLETAS ENTRE NOVEMBRO DE 1998 E MAIO DE 1999.....	78
TABELA 8 – REPETIBILIDADES (R) E DESVIOS PADRÕES DA REPETIBILIDADE ( $s_{(R)}$ ) OBTIDOS PARA AS VARIÁVEIS UTILIZADAS COMO MARCADORES PARA A SELEÇÃO DE ANIMAIS RESISTENTES ÀS PARASIToses, CONSIDERANDO k COLETAS DE DADOS DAS OVELHAS.....	84
TABELA 9 – PERCENTAGEM DE CORDEIROS POSITIVOS PARA OVOS DE <i>MONIEZIA</i> SP. E OOCISTOS DE <i>EIMERIA</i> SPP. NO MÉTODO DE WILLIS (1927, P. 375-376), POR DATA DE COLETA.....	100
TABELA 10 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE EOSINÓFILOS CIRCULANTES DOS CORDEIROS, REALIZADAS DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	103
TABELA 11 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE DO PARA IgG ANTI- <i>HAEMONCHUS</i> DOS CORDEIROS, REALIZADAS DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	105
TABELA 12 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE DO PARA IgE ANTI- <i>HAEMONCHUS</i> DOS CORDEIROS, DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	106
TABELA 13 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE UNIDADES DE IgE TOTAL DOS CORDEIROS, REALIZADAS DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	107

TABELA 14 – CORRELAÇÕES DE SPEARMAN ENTRE OPG, EOSINÓFILOS CIRCULANTES, IgE TOTAL, IgE E IgG ESPECÍFICAS DOS CORDEIROS, CONSIDERANDO TODAS AS COLETAS ENTRE OUTUBRO DE 1998 E JUNHO DE 1999.....	108
TABELA 15 – REPETIBILIDADES (R) E DESVIOS PADRÕES DA REPETIBILIDADE ( $s_{(R)}$ ) OBTIDOS PARA AS VARIÁVEIS UTILIZADAS COMO MARCADORES PARA A SELEÇÃO DE ANIMAIS RESISTENTES ÀS PARASITOSE, CONSIDERANDO k COLETAS DE DADOS DOS CORDEIROS.....	122
TABELA 16 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS COM BASE NO OPG DO SEGUNDO (HIPÓTESE 1), TERCEIRO (HIPÓTESE 2) OU QUARTO PICO DE VERMINOSE (HIPÓTESE 3) PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT.....	127
TABELA 17 – CLASSIFICAÇÃO DOS CORDEIROS EM RESISTENTES (R) OU SUSCEPTÍVEIS (S) DE ACORDO COM A ANÁLISE DE CLUSTER OBTIDA A PARTIR DO OPG DO SEGUNDO (HIPÓTESE 1), TERCEIRO (HIPÓTESE 2) OU QUARTO PICO DE VERMINOSE (HIPÓTESE 3).....	128
TABELA 18 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS COM BASE NO OPG DOS TRÊS PICOS DE OPG PÓS DESMAME PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT.....	129
TABELA 19 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO “HIGH RESPONDERS” E “LOW RESPONDERS” AOS PARASITOS GASTRINTESTINAIS COM BASE NA IGE ESPECÍFICA DAS COLETAS 5, 8 E 14 (HIPÓTESE A); 5, 10 E 14 (HIPÓTESE B); IGE TOTAL DAS COLETAS 5, 8 E 14 (HIPÓTESE C); 5, 10 E 14 (HIPÓTESE D); PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT.....	136

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO BIOLÓGICO DOS TRICOSTRONGILÍDEOS.....	8
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOMÁTICO DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> (H.c.).....	40
FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE ENZIMA-IMUNOENSAIO INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> (H.c.).....	44
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE ENZIMA-IMUNOENSAIO INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgE ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> (H.c.) SEGUNDO SHAW <i>ET AL.</i> (1998, p.295).....	50
FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE ENZIMA-IMUNOENSAIO DE CAPTURA PARA QUANTIFICAÇÃO DA IgE SÉRICA TOTAL, SEGUNDO SHAW <i>ET AL.</i> (1996, p.235-251).....	53



## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - TOTAL DE CHUVAS (mm) NA CIDADE DE CURITIBA, NO PERÍODO DE JUNHO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	55
GRÁFICO 2 - MÉDIAS DAS TEMPERATURAS MÁXIMAS, MÉDIAS E MÍNIMAS POR MÊS, NA CIDADE DE CURITIBA, NO PERÍODO DE JUNHO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	55
GRÁFICO 3 - VALORES DE DENSIDADE ÓPTICA (DO) DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO SOMÁTICO DO PARASITO ADULTO POR ORIFÍCIO, QUANDO OS SOROS FORAM DILUÍDOS 1:80 E O CONJUGADO ANTI-IgG OVINA 1:1000 VEZES.....	60
GRÁFICO 4 - VALORES DE DENSIDADE ÓPTICA (DO) DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DOS SOROS CONTROLES, QUANDO A PLACA FOI SENSIBILIZADA COM 500 ng DE ANTÍGENO H.c. POR ORIFÍCIO E O CONJUGADO ANTI-IgG OVINA FOI DILUÍDO 1:1000 VEZES.....	62
GRÁFICO 5 - VALORES DE DENSIDADE ÓPTICA (DO) DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DO CONJUGADO ANTI-IgG OVINA, QUANDO A PLACA FOI SENSIBILIZADA COM 500 ng DE ANTÍGENO H.c. POR ORIFÍCIO E OS SOROS CONTROLES FORAM DILUÍDOS 1:80 VEZES.....	63
GRÁFICO 6 - MÉDIA MENSAL DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS ADULTAS, NO PERÍODO DE JULHO DE 1998 A MAIO DE 1999.....	68
GRÁFICO 7 - MÉDIA MENSAL DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS ADULTAS, POR TIPO DE OVO ENCONTRADO, NO PERÍODO DE JULHO DE 1998 A MAIO DE 1999.....	68
GRÁFICO 8 - PREVALÊNCIA DE GÊNEROS DE HELMINTOS ENCONTRADOS NAS CULTURAS DE FEZES DAS OVELHAS, NOS MESES DE JULHO DE 1998 (a), SETEMBRO DE 1998 (b), MARÇO DE 1999 (c) E MAIO DE 1999 (d), BEM COMO NA PERCENTAGEM DO TOTAL DE LARVAS RECUPERADAS (e).....	71
GRÁFICO 9 - MÉDIA DE EOSINÓFILOS POR MILÍMETRO CÚBICO DE SANGUE E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS, DURANTE O PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999.....	73
GRÁFICO 10 - MÉDIA DE DENSIDADE ÓPTICA PARA IGG ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> (H.c.) E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS, DURANTE O PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999.....	75

GRÁFICO 11 – MÉDIA DE DENSIDADE ÓPTICA PARA IGE ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> (H.C.) E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS, DURANTE O PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999.....	77
GRÁFICO 12 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1999, CORRESPONDENTE AO PICO DE PARASITISMO DE OUTONO.....	85
GRÁFICO 13 – DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DO LOGARITMO DECIMAL DO NÚMERO DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES MAIS UMA UNIDADE (Log (OPG+1)) DA COLETA DE 30 DE MARÇO DAS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO RESISTENTES OU SUSCEPTÍVEIS PELO MARCADOR PARASITOLÓGICO (OPG).....	87
GRÁFICO 14 – DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DO LOGARITMO DECIMAL DO NÚMERO DE EOSINÓFILOS POR MILÍMETRO CÚBICO DE SANGUE (Log (EOSINO)), PROVENIENTE DA COLETA DE 30 DE MARÇO, DAS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO RESISTENTES OU SUSCEPTÍVEIS PELO MARCADOR PARASITOLÓGICO (OPG).....	87
GRÁFICO 15 – DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DO LOGARITMO DECIMAL DA DENSIDADE ÓPTICA PARA IgE ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> (Log (IgE)), PROVENIENTE DA COLETA DE 30 DE MARÇO, DAS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO RESISTENTES OU SUSCEPTÍVEIS PELO MARCADOR PARASITOLÓGICO (OPG).....	88
GRÁFICO 16 – DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DO LOGARITMO DECIMAL DA DENSIDADE ÓPTICA PARA IgG ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> (Log (IgG)), PROVENIENTE DA COLETA DE 30 DE MARÇO, DAS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO RESISTENTES OU SUSCEPTÍVEIS PELO MARCADOR PARASITOLÓGICO (OPG).....	88
GRÁFICO 17 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES, EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE E IGG ANTI – <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> DE TODAS AS COLETAS DAS OVELHAS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999.....	90
GRÁFICO 18 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES, EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE E IGG ANTI – <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> DA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999.....	90
GRÁFICO 19 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES E EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS DA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999.....	92
GRÁFICO 20 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES E IGE ANTI – <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> DA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999.....	92
GRÁFICO 21 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES E IGG ANTI – <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> DA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999.....	93

GRÁFICO 22 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE EOSINÓFILOS POR MM <sup>3</sup> DE SANGUE DA SEXTA E SÉTIMA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADAS EM 30 DE MARÇO E 27 DE ABRIL DE 1999, RESPECTIVAMENTE.....	94
GRÁFICO 23 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE EOSINÓFILOS POR MM <sup>3</sup> DE SANGUE DA QUINTA E SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADAS EM 02 E EM 30 DE MARÇO DE 1999, RESPECTIVAMENTE.....	94
GRÁFICO 24 - MÉDIA DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) NOS CORDEIROS ACOMPANHADOS DE JULHO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	98
GRÁFICO 25 - MÉDIA DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG), POR TIPO DE OVO, NOS CORDEIROS ACOMPANHADOS DE JULHO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	98
GRÁFICO 26 - PREVALÊNCIA DE GÊNEROS DE HELMINTOS ENCONTRADOS NAS CULTURAS DE FEZES DOS CORDEIROS, NOS MESES DE NOVEMBRO (a) E DEZEMBRO DE 1998(b), JANEIRO(c), FEVEREIRO (d), MARÇO (e), ABRIL (f) MAIO (g) E JUNHO DE 1999 (h), BEM COMO NA PERCENTAGEM DO TOTAL DE LARVAS RECUPERADAS (i).....	101
GRÁFICO 27 - MÉDIA DE EOSINÓFILOS POR MILÍMETRO CÚBICO DE SANGUE E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DOS CORDEIROS, DURANTE O PERÍODO DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	103
GRÁFICO 28 - MÉDIA DE IgG ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DOS CORDEIROS, DURANTE O PERÍODO DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	105
GRÁFICO 29 - MÉDIA DE IgE ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DOS CORDEIROS, DURANTE O PERÍODO DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	106
GRÁFICO 30 - MÉDIA DE IgE SÉRICA TOTAL E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DOS CORDEIROS, DURANTE O PERÍODO DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999.....	107
GRÁFICO 31 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES DA QUINTA COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADA EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998.....	124
GRÁFICO 32 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES DA DÉCIMA COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADA EM 09 DE FEVEREIRO DE 1999.....	125
GRÁFICO 33 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES DA 14. <sup>a</sup> COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADA EM 04 DE MAIO DE 1999.....	125
GRÁFICO 34 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) E DE IGE ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> DA 5. <sup>a</sup> , 8. <sup>a</sup> E 14. <sup>a</sup> COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 12 DE JANEIRO E 04 DE MAIO DE 1999.....	133

GRÁFICO 35 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) E DE IGE ANTI- <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> DA 5. <sup>a</sup> , 10. <sup>a</sup> E 14. <sup>a</sup> COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 09 DE FEVEREIRO E 04 DE MAIO DE 1999.....	133
GRÁFICO 36 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) E DE IGE TOTAL DA 5. <sup>a</sup> , 8. <sup>a</sup> E 14. <sup>a</sup> COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 12 DE JANEIRO E 04 DE MAIO DE 1999.....	134
GRÁFICO 37 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) E DE IGE TOTAL DA 5. <sup>a</sup> , 10. <sup>a</sup> E 14. <sup>a</sup> COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 09 DE FEVEREIRO E 04 DE MAIO DE 1999.....	134

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC- Citotoxicidade dependente de anticorpos;  
AgResearch - *New Zealand Pastoral Agriculture Research Institute Limited*  
APC – Célula apresentadora de antígeno;  
BSA – albumina sérica bovina;  
C- Fator da cascata do complemento;  
CD – *cluster* de diferenciação;  
CSF – Fator estimulante de colônias;  
CSF-GM – Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos;  
dil. – diluição;  
DO – densidade óptica;  
DTH – Hipersensibilidade do tipo retardado;  
EDTA – Ácido etileno-diamino-tetra-acético;  
Eosino – eosinófilo(s);  
FAP – Fator de agregação plaquetária;  
FcεR - receptor de cadeia ε (IgE);  
FQEA – Fator quimiotático dos eosinófilos e da anafilaxia;  
H.c. – *Haemonchus contortus*;  
IFN – interferon ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ );  
Ig - imunoglobulina;  
IL – interleucina;  
mAb – anticorpo monoclonal;  
MBP – Proteína básica principal do núcleo cristalóide do eosinófilo;  
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (Marcadores celulares tipo I e II);  
NK – células exterminadoras naturais ou *Natural Killer*  
L<sub>1</sub> – Larva de primeiro estágio;  
L<sub>2</sub> – Larva de segundo estágio;  
L<sub>3</sub> – Larva de terceiro estágio;  
L<sub>4</sub> – Larva de quarto estágio;  
L<sub>5</sub> – Larva de quinto estágio;  
LAK – células exterminadoras ativadas por linfocina;  
OPD – orto-fenileno-diamino;  
opg – número de ovos de helmintos por grama de fezes;  
PBS – tampão fosfato;  
pH – potencial hidrogeniônico;  
SAS – sulfato de amônio saturado;  
TCR – Marcador de células T (tipo  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ );  
Th – Célula T auxiliar (Tipo 1 ou 2);  
TMB – Tetra-metil-benzidino;  
TNF – Fator de necrose tumoral ( $\alpha$  ou  $\beta$ );  
UFPR - Universidade Federal do Paraná;  
WC – *Workshop cluster*

## RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram estudar a resposta imune dos ovinos aos parasitos gastrintestinais quando submetidos à infecção natural e avaliar a possibilidade de se identificar animais resistentes às parasitoses por meio de marcadores parasitológicos e imunológicos. Para isso, foi acompanhado um rebanho de 20 ovelhas e 25 cordeiros, na Região de Curitiba, Paraná. Os animais foram avaliados no período de julho de 1998 a junho de 1999, por meio de coletas mensais de sangue e fezes. O marcador parasitológico utilizado foi o número de ovos de helmintos por grama de fezes (opg); os marcadores imunológicos foram o número de eosinófilos sanguíneos, Imunoglobulina G (IgG) específica, Imunoglobulina E (IgE) total e específica. O antígeno utilizado para a mensuração dos anticorpos específicos foi o extrato bruto de *Haemonchus contortus* adultos. As ovelhas apresentaram um padrão de resposta à verminose definido para cada animal, o que possibilitou que cada indivíduo fosse identificado como resistente ou susceptível pelo opg. Ovelhas resistentes tiveram menores médias de opg e maiores médias de eosinófilos que as susceptíveis. O nível de anticorpos se mostrou variável entre os grupos, mas houve uma tendência do grupo susceptível em apresentar menores médias de IgE e maiores de IgG específica que o grupo resistente. Tanto o número de eosinófilos quanto a IgE específica poderiam ser utilizados concomitantemente com o opg para a identificação de ovelhas resistentes e susceptíveis. O número de eosinófilos sanguíneos foi o único marcador imunológico capaz de classificar as ovelhas indiretamente nos mesmos grupos obtidos para o opg. Os cordeiros mostraram uma estabilização no comportamento das variáveis imunológicas por volta dos seis meses e meio de idade, indicando um padrão de resposta imune aos helmintos gastrintestinais. Contudo, esta resposta não foi completa e, em alguns animais, variou conforme o pico de parasitismo. A identificação de cordeiros resistentes só foi possível com os dados de opg de três picos de parasitose pós-desmame. Cordeiros resistentes tenderam a ter maiores médias de eosinófilos circulantes, IgE total, IgE e IgG específicas que os susceptíveis, mas somente para IgE total e específica as diferenças foram significativas durante a maior parte do acompanhamento. Foi possível identificar indiretamente cordeiros de alto e baixo opg pelos dados de IgE específica, medidos durante os três picos de parasitismo. Tanto para seleção direta pelo opg quanto indireta pela IgE anti-*H. contortus*, foram necessários dados de três picos de parasitismo pós-desmame. Portanto, para ambos os marcadores, os cordeiros somente puderam ser selecionados quando tinham uma média de dez meses de idade.

**Palavras-chave:** ovinos, resistência aos parasitos, eosinófilos, IgG, IgE

## ABSTRACT

This work was conducted in order to study the immune response of sheep subjected to natural challenge of gastrointestinal parasites and to verify the possibility of identifying animals that are resistant to parasites through parasitological and immunological markers. Twenty ewes and 25 lambs from a farm in Curitiba, Parana, Brazil, were sampled monthly for blood and faeces, from July of 1998 to June of 1999. Faecal egg count (FEC) was chosen as parasitological marker. The number of peripheral eosinophils, total and specific IgE and specific IgG antibodies were used as immunological markers. A somatic extract from adult *Haemonchus contortus* was used as antigen for the specific antibody assays. Each ewe had a pattern of response to helminths during the whole experimental period. This allowed each animal to be classified as resistant or susceptible by FEC. Resistant ewes had lower FEC and higher number of peripheral eosinophils than susceptible ewes. Antibody levels were very variable in both groups, but there was a tendency of susceptible sheep to have lower IgE and higher IgG than resistant ones. Both peripheral eosinophils and specific IgE data could be joined to FEC in order to identify resistant or susceptible animals. The number of peripheral eosinophils was the only immunological maker that was able to classify high and low FEC ewes in two different groups. The lambs showed stabilisation of the level of immunological markers when they had reached 28 weeks of age. But this was not a definitive and complete response. Some of the animals showed a slight variation from one challenge to another. The identification of resistant or susceptible lambs was possible when data of three peaks of FEC post-weaning were analysed. There was a tendency for resistant lambs to show higher means for peripheral eosinophils, specific IgG, total and specific IgE, but only for total and specific IgE were the differences significant. It was possible to identify indirectly high and low FEC lambs using specific IgE of three peaks of FEC. Selection of lambs based both on FEC or in specific IgE required data from three peaks of parasitism post-weaning. Therefore, lambs could be selected only when they had reached 10 months of age.

**Key words:** sheep; resistance to nematodes; eosinophils; IgG; IgE

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie ovina é a que tem mostrado maior crescimento entre os outros animais explorados zootecnicamente no Estado do Paraná. No ano de 2000, o rebanho estadual foi estimado em 592.692 cabeças (SEAB, 2001). Este alto número de animais se deve a um programa de incentivo do governo paranaense, que trouxe do Rio Grande do Sul e Uruguai cerca de 250 mil ovelhas no período de 1992 a 1994 (SOUZA, 1997, p.8). O rápido aumento do rebanho paranaense exige um aprimoramento técnico e científico que possibilite um incremento na produtividade.

Um dos principais problemas da ovinocultura paranaense é a verminose. Isso se deve principalmente às características de criação em nosso estado. Normalmente os ovinos são criados em pequenas áreas e com superlotação, fazendo com que o alto número de larvas de helmintos nas pastagens seja uma fonte de infecção constante. Os ovinocultores, tentando controlar esta situação, passaram a utilizar esquemas de desverminação múltipla (de 30 em 30 dias) ou supressiva (de 15 em 15 dias). Esta metodologia resultou em um alto custo de tratamento e no rápido aparecimento da resistência dos parasitos aos vários princípios ativos (THOMAZ-SOCCOL, 1996, p.421-422; SOUZA, 1997, p.8; 62-69).

O problema da resistência dos nematódeos aos anti-helmínticos é uma preocupação de caráter mundial (WALLER, 1994, p.233-243). Assim, novas alternativas para o controle da verminose ovina têm sido pesquisadas. Uma delas seria a seleção de animais geneticamente resistentes aos parasitos gastrintestinais.

ALBERS *et al.* (1987, p. 1355) consideram como resistência aos parasitos gastrintestinais a habilidade dos ovinos em impedir o estabelecimento e/ou subsequente desenvolvimento da infecção parasitária. A quantificação da carga parasitária seria a forma mais direta de se avaliar esta característica (KASAI *et al.*, 1990, p.62). Como este método implica em morte do animal, outros caracteres fenotípicos têm sido estudados como alternativa para identificação dos animais



resistentes. Estes caracteres são chamados marcadores de animais resistentes e susceptíveis às parasitoses.

A quantidade de ovos de helmintos por grama de fezes (opg) tem sido um dos marcadores mais utilizados, uma vez que ela tende a refletir o grau de infecção do parasito no hospedeiro. Na literatura, são propostos diferentes esquemas de seleção baseados no opg (ALBERS *et al.*, 1987, p.1355-1363; WOOLASTON *et al.*, 1990, p.1015; MORRIS *et al.*, 1997, p.319-329; SOTOMAIOR, 1997, p. 28-97; SCHMIDT, 2000, p.54-77).

A resistência genética dos ovinos ao *Haemonchus contortus* resulta da expressão de uma resposta imunológica adquirida (GILL, 1991, p.625). Esta hipótese pode ser confirmada pelo desaparecimento das diferenças na resistência ao *H. contortus* em animais tratados com imunossupressores (BUDDLE *et al.*, 1992, p.955-960; DOUCH *et al.*, 1994, p.921-928). Portanto, uma alternativa na seleção de animais resistentes seria a identificação de animais imunologicamente mais competentes ("*high responders*").

O principal mecanismo de resposta imune aos helmintos gastrintestinais é a ativação de células T auxiliares do tipo 2 em resposta ao antígeno parasitário (TIZARD, 1998, p.334). Isso resulta na produção de anticorpos das classes IgG, IgA e, principalmente, IgE. A combinação dos antígenos do parasito com anticorpos da classe IgE conjugada a mastócitos resulta na degranulação destes, com liberação de aminas vasoativas e fatores quimiotáticos dos eosinófilos. Em resposta a esses fatores, há mobilização dos eosinófilos da medula óssea para a corrente sanguínea, resultando em eosinofilia.

Como a eosinofilia está sob controle genético, muitos trabalhos têm sido realizados tentando correlacioná-la com a maior ou menor resistência aos helmintos (BUDDLE *et al.*, 1992, p.955-960; WOOLASTON *et al.*, 1996, p.123-126; SOTOMAIOR, 1997, p. 28-97; SCHMIDT, 2000, p. 54-77). Da mesma forma, vários trabalhos têm sido conduzidos de forma a correlacionar níveis séricos de IgM, IgG e IgA com o

estabelecimento parasitário no hospedeiro ovino (DAWKINS *et al.* 1988, p. 531-537; GILL, 1991, p. 617-628; GILL *et al.* 1992, p. 179-187; p. 617-628; STEAR *et al.*, 1995a, p.375-380; b, p. 643-652; PFEFER *et al.*, 1996, p. 765-773; ISRAF *et al.*,1997, p.39-52) e a utilizar estes níveis como marcadores imunológicos para seleção de animais resistentes (DOUCH *et al.*, 1995, p.121-132; DOUCH *et al.*, 1996, p. 899-909).

Quanto à IgE, seu recente isolamento para utilização em enzima-imunoensaio por SHAW *et al.* (1996, p. 235-251) e KOOYMAN *et al.* (1997, p. 395-406) já permitiu verificar que animais selecionados para resistência apresentam maiores níveis séricos deste anticorpo que os selecionados para susceptibilidade (SHAW *et al.*,1999, p. 25-32). Entretanto, até o presente momento não foi realizado nenhum estudo sobre a viabilidade de se selecionar animais resistentes às parasitoses pelos níveis de IgE anti-helminto.

Para a seleção de um rebanho, pode-se optar pelo uso de um (ALBERS *et al.*, 1987, p.1355-1363; WOOLASTON *et al.*, 1990, p.1015; SRÉTER *et al.*, 1994, p. 871-876; DOUCH *et al.*, 1995, p.121-132; MORRIS *et al.*, 1997, p.319-329) ou mais marcadores, formando um índice ou matriz de seleção (DOUCH *et al.*, 1996, p. 901; SOTOMAIOR, 1997, p. 28-97; SCHMIDT, 2000 p. 54-77). O melhorista deverá escolher a(s) característica(s) que melhor se adapte(m) a seu programa de seleção para um determinado rebanho. A característica ideal para ser utilizada como marcador deve apresentar alta herdabilidade, alta repetibilidade, baixo custo e uma análise automatizada; as amostras (de sangue ou fezes) devem ser de fácil obtenção e passíveis de serem estocadas o maior tempo possível. Dos marcadores estudados até agora, a detecção do nível de anticorpos anti-helminto pelo enzima-imunoensaio parece ser o método que melhor se enquadra neste perfil (DOUCH *et al.*, 1996, p.901-904).

A seleção de ovinos resistentes como alternativa para o problema da parasitose gastrointestinal em ovinos do Estado do Paraná deve levar em consideração: (1) a possibilidade de descarte das fêmeas susceptíveis em rebanhos comerciais, mantendo-

se o maior número possível de matrizes resistentes para reprodução; (2) a seleção precoce de cordeiros machos para reprodutores, possibilitando o abate dos animais descartados ainda no período de melhor qualidade de carcaça. Assim, faz-se necessário o estudo de esquemas de seleção eficientes, baseados em um ou mais marcadores, que sejam capazes de atender a estes objetivos com o menor ônus possível.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

1. estudar o comportamento imunológico dos ovinos às parasitoses quando submetidos à infecção natural
2. avaliar a possibilidade de se identificar animais resistentes às parasitoses por meio um marcador parasitológico (direto) ou, indiretamente, por meio de marcadores imunológicos

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. obter o extrato somático de parasitos adultos, da espécie *Haemonchus contortus*, e verificar sua utilidade como antígeno para provas de imunoensaio para detecção de anticorpos específicos
2. padronizar a técnica de enzima-imunoensaio para detecção de IgG específica anti-*Haemonchus contortus*
3. selecionar diretamente animais (adultos e jovens) resistentes e susceptíveis pelo marcador parasitológico
4. verificar se os grupos resistente e susceptível apresentam diferença na resposta imune ao antígeno parasitário
5. avaliar a possibilidade de selecionar indiretamente animais resistentes utilizando o número de eosinófilos circulantes ou a densidade óptica para pesquisa de anticorpos específicos das classes IgG e IgE como marcadores
6. determinar a partir de que idade seria possível a seleção de cordeiros resistentes às parasitoses
7. estudar a cinética da resposta imune dos cordeiros ao parasitos
8. verificar o nível de correlação entre os marcadores parasitológicos e imunológicos

9. correlacionar os valores imunológicos e parasitológicos dos cordeiros com sua idade, peso ao nascer e ao desmame, a fim de estudar o desenvolvimento da resposta imune protetora
10. correlacionar os valores imunológicos e parasitológicos de mães e filhos a fim de estimar o grau de determinação genética destas características

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

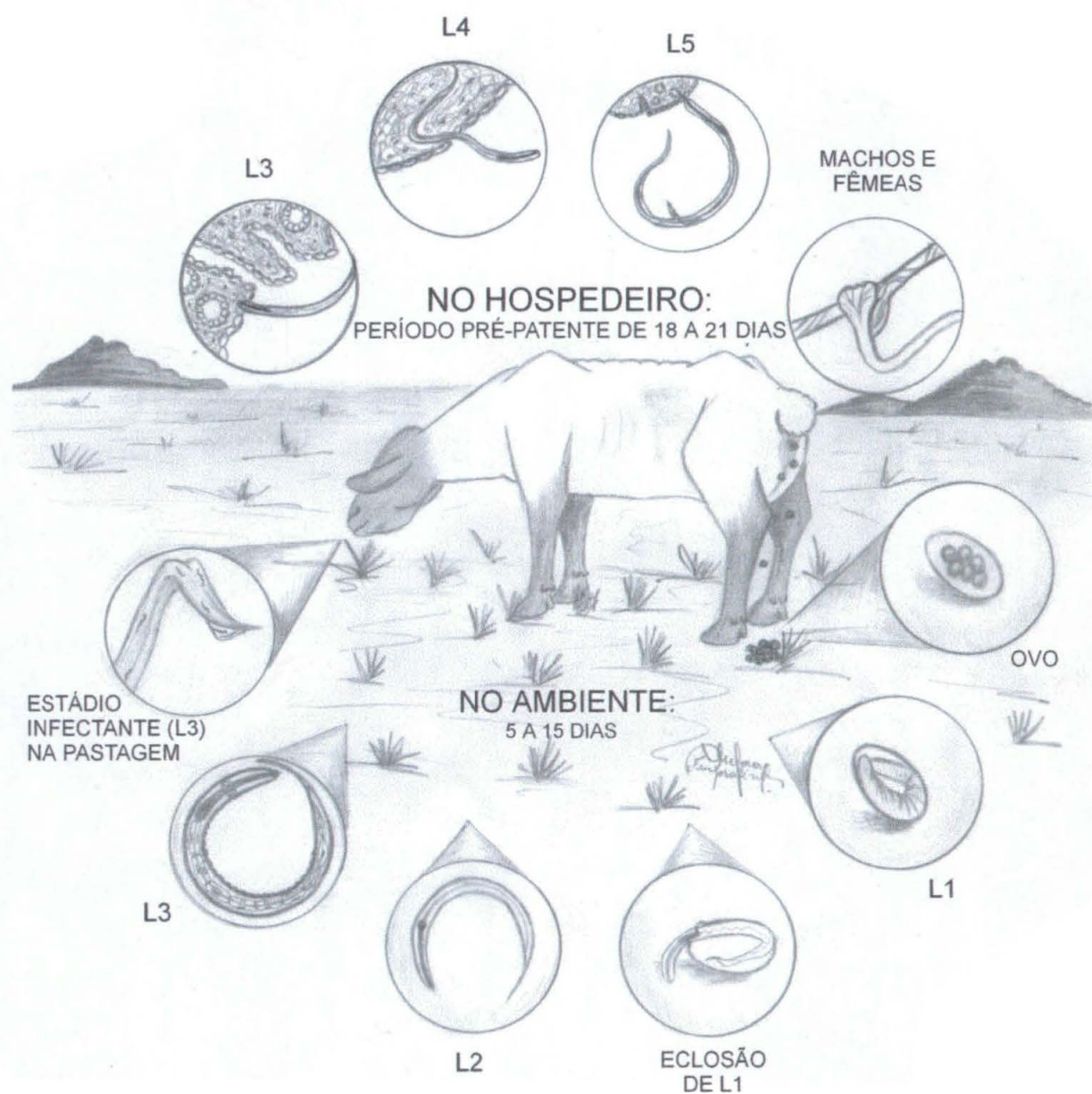
Os helmintos gastrintestinais são uma das maiores causas de perdas econômicas na ovinocultura. Embora não hajam estatísticas oficiais, sabe-se que estas perdas são significativas no Estado do Paraná. MORAES *et al.* (1998, p.427) relataram que uma propriedade paranaense com apenas 250 animais teria um gasto anual de 2.850 reais com anti-helmínticos. Além do gasto com medicamentos, a verminose envolve ainda a diminuição da conversão alimentar, do ganho de peso, da produção de carne, lã e leite, cujos valores são difíceis de serem estimados, especialmente quando a parasitose é subclínica (SYKES, 1978, p.32). No prejuízo total da verminose à ovinocultura, deve ainda ser contabilizado a perda de animais por óbito.

#### 3.1 PRINCIPAIS HELMINTOS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA NA OVINOCULTURA

Os principais nematódeos gastrintestinais de importância econômica pertencem à família Trichostrongylidae (Leiper, 1912), gêneros *Haemonchus* sp.; *Trichostrongylus* spp.; *Teladorsagia* spp.; *Ostertagia* spp.; *Nematodirus* spp. e *Cooperia* spp.. De uma forma geral esses parasitos coexistem em infecções mistas, sendo que a prevalência de um ou mais gêneros dependem do clima da região, da estação do ano, da categoria animal e das condições da propriedade (SANTIAGO *et al.*, 1976, p.1-7; NARI e CARDOZO, 1987, p.12; ECHEVARRIA, 1996b, p. 162-163; MORAES *et al.*, 1998, p.427; OLIVEIRA *et al.*, 1999, p.494).

O ciclo biológico destes helmintos é muito semelhante (FIGURA 1). O animal parasitado elimina ovos nas fezes, dos quais eclodem larvas, que se desenvolvem na pastagem. As larvas realizam duas mudas até atingir o estágio infectante, o que demora de 5 dias a várias semanas, dependendo das estações do ano e das condições

FIGURA 1 - CICLO BIOLÓGICO DOS TRICOSTRONGILÍDEOS



ambientais. O ovino se infecta ao ingerir forragem contaminada com estádios infectantes (larvas de terceiro estágio ou L<sub>3</sub>). Ao atingir seu *habitat* definitivo (abomaso ou intestino delgado), as L<sub>3</sub> sofrem duas novas mudas e diferenciam-se em machos e fêmeas parasitos. De duas a três semanas após a ingestão da L<sub>3</sub>, o helminto completa o seu desenvolvimento, sendo possível encontrar ovos nas fezes do novo hospedeiro (ECHEVARRIA, 1996a, p. 54; URQUHART *et al.*, 1990, p.20-21).

### 3.1.1 Parasitos de abomaso

#### a) *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)

*Haemonchus contortus* são parasitos grandes, hematófagos, facilmente identificados durante uma necropsia. As fêmeas apresentam de 18 a 30 mm; os machos, 10 a 20 mm (UENO e GONÇALVES, 1994, p.92).

Em regiões tropicais e subtropicais do planeta, tais como a África do Sul (BISSET *et al.*, 2001, p.3); parte da Austrália (ALBERS *et al.*, 1987, p.1355); o Uruguai (NARI e CARDOZO, 1987, p.12); Rio Grande do Sul (SANTIAGO *et al.*, 1976, p.2; ECHEVARRIA, 1996b, p.157-163), São Paulo (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 2000, p.447-452) e Paraná (MORAES *et al.* 1998, p. 427; OLIVEIRA *et al.* 1999, p.494), o *Haemonchus* é relatado como o parasito de maior importância econômica para o rebanho ovino. Embora presente durante o ano todo, sua predominância sobre os demais gêneros se evidencia nos meses de verão e outono, pois os estádios exógenos apresentam desenvolvimento ótimo em temperatura e umidade elevadas.

A principal causa da patogenia da haemoncose advém do hematofagismo realizado pelo parasito. Cada helminto adulto remove cerca de 0,05 ml de sangue por dia, por ingestão e extravasamento das lesões (URQUHART *et al.*, 1990, p.21). Desta forma, um animal parasitado com 2.000 parasitos perde cerca de 100 ml de sangue por dia.



De acordo com o grau de infecção e, conseqüentemente, com o grau de anemia, a haemoncose pode ser classificada em três formas. A primeira é a haemoncose hiperaguda, que ocorre em infecções maciças de cerca de 30.000 helmintos. Animais aparentemente sadios apresentam morte súbita por gastrite hemorrágica grave. A segunda, ou haemoncose aguda, é caracterizada por uma anemia evidente, com queda progressiva no hematócrito. Em um segundo momento, ocorre um aumento compensatório da eritropoese na medula óssea, estabilizando o hematócrito em um nível baixo. Entretanto, a perda contínua de ferro e proteína sem reposição adequada leva ao esgotamento da medula óssea e à morte do hospedeiro. A terceira forma clínica, ou haemoncose crônica, é a que ocorre quando poucas centenas de helmintos estão presentes. Neste caso, a pequena carga parasitária não é capaz de promover uma anemia evidente, mas a espoliação pode intensificar os efeitos de uma nutrição inadequada do hospedeiro. Assim, os sinais clínicos observados são emagrecimento progressivo e fraqueza (NARI e CARDOZO, 1987, p.8; URQUHART *et al.*, 1990, p.21).

Além dos diversos graus de anemia, o aparecimento de edema pela perda de macromoléculas também é importante. O edema submandibular e a ascite são as manifestações clínicas mais frequentes (URQUHART *et al.*, 1990, p.21).

b) *Teladorsagia* spp. (Andreeva e Satubaldin, 1954) e *Ostertagia* spp. (Ransom, 1907)

As fêmeas dos Ostertagiídeos apresentam 9 a 12 mm de comprimento e os machos, 7 a 8 mm (UENO e GONÇALVES, 1994, p.92). Quatro espécies são descritas em ovinos no Paraná (OLIVEIRA *et al.* 1999, p.494): *T. circumcincta* (Stadelmann, 1894), *T. trifurcata* (Ransom, 1907), *O. ostertagi* (Stiles, 1892) e *O. lyrata* (Sjöberg, 1926).

A ostertagiose é um problema sobretudo para bovinos jovens criados em regiões de clima temperado (URQUHART *et al.*, 1990, p.13-14). Apesar de apresentar

importância em rebanhos ovinos na Europa (URQUHART *et al.*, 1990, p.17) e Nova Zelândia (BISSET *et al.*, 2001, p.3), os ostertagiídeos apresenta baixa prevalência em ovinos em estudos realizados na América do Sul (SANTIAGO *et al.*, 1976, p.3; NARI e CARDOZO, 1987, p.12; ECHEVARRIA, 1996b, p.161-163; MORAES *et al.* 1998, p. 427). Entretanto, na região de Guarapuava, Paraná, estes parasitos foram encontrados em níveis patogênicos no final de verão e no início da primavera (OLIVEIRA *et al.* 1999, p.494).

Uma característica dos nematódeos deste gênero é a penetração, desenvolvimento e emergência de estádios de larvares nas glândulas gástricas. Isso leva à lesão do epitélio gástrico e das células parietais, produtoras de ácido clorídrico. Esta lesão, mais intensa no momento da emergência da L<sub>4</sub>, provoca um aumento do pH abomasal para valores de 6 a 7. Como a conversão do pepsinogênio em pepsina praticamente não ocorre em pH acima de 3,5 a 4,0, a digestão protéica fica prejudicada (SYKES, 1976, p.32). Além disso, a ação bacteriostática do fluido abomasal fica diminuída, predispondo à infecções bacterianas secundárias (URQUHART *et al.*, 1990, p.13).

Um sinal clínico, também associado à má digestão, é a diminuição do apetite do animal. Uma queda de até 25% no consumo de alimentos pode ser observada após as primeiras semanas de infecção com *T. circumcincta*, em doses diárias de 4 000 L<sub>3</sub>. Infecções experimentais únicas mostram que a hiporexia é mais evidente na fase em que a larva de quarto estágio emerge da mucosa (SYKES, 1976, p.32).

Com a evolução da infecção, ocorre uma reação inflamatória, com aumento da permeabilidade do epitélio abomasal a macromoléculas. Esta alteração permite o escape do pepsinogênio para a corrente sanguínea, bem como a perda de proteínas plasmáticas para a luz, resultando em aumento no nível de pepsinogênio plasmático e hipoalbuminemia (URQUHART *et al.*, 1990, p.13).

c) *Trichostrongylus axei* (Cobbold, 1879)

As fêmeas apresentam 5 a 7 mm e os machos, 4 a 5mm (UENO e GONÇALVES, 1994, p.92). São assinalados no Estado do Paraná, mas com pouca importância epidemiológica (MORAES *et al.* 1998, p. 427; OLIVEIRA *et al.* 1999, p.494). Sua lesão é semelhante à descrita para *Ostertagia*, exceto que as L<sub>3</sub> não penetram nas glândulas gástricas, mas sim entre elas (URQUHART *et al.*, 1990, p.26).

### 3.1.2 Parasitos de Intestino Delgado

a) *Trichostrongylus colubriformis* (Giles, 1892)

Os *Trichostrongylus* são parasitos muito pequenos, filiformes e de difícil visualização. As fêmeas medem de 5 a 12 mm e os machos, 4 a 8 mm (UENO e GONÇALVES, 1994, p.93).

O *T. colubriformis* é a espécie de maior frequência em regiões subtropicais e temperadas do mundo. Pode ser causa primária da verminose clínica em regiões temperadas (URQUHART *et al.*, 1990, p.23), como na maior parte da Nova Zelândia (BISSET *et al.*, 2001). MORAES *et al.* (1998, p. 427) e OLIVEIRA *et al.* (1999, p.494) mostram que este parasito é ainda mais prevalente que o *H. contortus* em algumas regiões do Paraná. Contudo, a maior patogenicidade da segunda espécie a torna mais importante. De uma forma geral, esta importância pode ser invertida em alguns meses de inverno e primavera, uma vez que os estádios de vida livre de *T. colubriformis* são mais resistentes ao frio e à dessecação que os de *H. contortus*.

As L<sub>3</sub> deste helminto devem penetrar entre as glândulas epiteliais da mucosa duodenal, formando túneis entre o epitélio e a lâmina própria, para completar seu ciclo evolutivo. Quando os parasitos voltam à luz intestinal para diferenciação em adultos, ocorre ruptura da mucosa, com edema, exsudação e hemorragia. As vilosidades se

tornam achatadas e sinuosas, diminuindo a superfície de absorção (URQUHART *et al.*, 1990, p.24). SYKES (1976, p.33) relata uma diminuição de até 10% na ingestão de alimentos pelo hospedeiro nesta fase do parasitismo, porém sem alteração da digestibilidade. Aparentemente a absorção em porções mais distais do intestino compensaria a deficiência de absorção de nutrientes no duodeno.

Mesmo com a digestibilidade da dieta pouco alterada, o animal parasitado apresenta deficiência energética e protéica. Um dos fatores que podem justificar este achado são algumas mudanças metabólicas observadas em animais doentes, como o aumento nos níveis de cortisol e queda dos níveis de insulina e tiroxina. Quanto à deposição protéica, outro fator que a diminui é o uso exacerbado das proteínas da dieta para síntese das proteínas plasmáticas. Uma vez que há grande perda destas para a luz, sua reposição torna-se indispensável para homeostase do indivíduo, em detrimento da deposição muscular (SYKES, 1976, p.33).

Os principais sinais clínicos da tricostrongilose seriam a diarreia, devido à enterite, e a diminuição do crescimento, em decorrência da baixa deposição de proteína, gordura, cálcio e fósforo (SYKES, 1976, p.33; URQUHART *et al.*, 1990, p.24). SYKES (1976, p.33) relata uma redução de 38% no ganho de peso, 50% na deposição de gordura, 77% na deposição de proteína e 99% na deposição de cálcio em animais parasitados com *T. colubriformis* em níveis subclínicos, quando comparados com animais livres de helmintos.

#### b) *Nematodirus* spp. (Ransom, 1907)

São parasitos cujas fêmeas medem de 15 a 20 mm de comprimento e os machos, de 10 a 15 mm (UENO e GONÇALVES, 1994, p.93). São exceção entre os Trichostrongylidae por apresentarem ovos com mais de 130 µm de comprimento (SLOSS *et al.*, 1999, p.47).

*Nematodirus spathiger* (Railliet, 1896) é a espécie mais prevalente do gênero, tanto no Rio Grande do Sul (SANTIAGO *et al.*, 1976, p.3; ECHEVARRIA, 1996b; p.161-163) quanto no Paraná (MORAES *et al.* 1998, p. 427; OLIVEIRA *et al.* 1999, p.494). São características desta espécie a manutenção da infecção por ovinos adultos ao longo do ano, resultando no desenvolvimento de mais de uma geração anual de parasitos (URQUHART *et al.*, 1990, p.30-33; SANTIAGO *et al.*, 1976, p.3). As espécies *N. battus* (Crofton e Tomas, 1951) e *N. filicollis* (Rudolph, 1802) também são assinaladas, mas sem importância epidemiológica (SANTIAGO *et al.*, 1976, p.3; MORAES *et al.* 1998, p. 427; OLIVEIRA *et al.* 1999, p.494). Aparentemente, ovinos adultos são imunes a estas espécies de *Nematodirus*. Desta forma, a transmissão é efetuada de cordeiro a cordeiro e é assinalada apenas uma geração anual (SANTIAGO *et al.*, 1976, p.3). A capacidade de sobrevivência da larva infectante por longos períodos permite a perpetuação da espécie de um ano para outro (URQUHART *et al.*, 1990, p.30-33).

As lesões causadas são semelhantes à do *T. colubriformis*. A emergência das larvas de quarto estágio está associada com grave lesão das vilosidades e erosão da mucosa. Isso resulta em posterior atrofia de vilosidades. Em infecções maciças, ocorre diarreia (URQUHART *et al.*, 1990, p.32).

#### c) *Cooperia* spp. (Ransom, 1907)

Parasitos pequenos e filiformes, que habitam o intestino delgado de ruminantes. As fêmeas têm 15 a 20 mm de comprimento, e os machos, de 10 a 15 mm (UENO e GONÇALVES, 1994, p.93). No Paraná, são descritas apenas duas espécies parasitas de ovinos (OLIVEIRA *et al.* 1999, p.494): *C. curticei* (Giles, 1892) e *C. punctata* (v. Linstow in Schnyder, 1907).

Apesar de presentes em várias regiões do mundo, este gênero de parasito é encontrado compondo uma porcentagem muito baixa da carga parasitária de ovinos

(SANTIAGO *et al.*, 1976, p.3; NARI e CARDOZO, 1987, p.12; ECHEVARRIA, 1996b, p.157-163; OLIVEIRA *et al.* 1999, p.494).

Sua lesão no epitélio intestinal é semelhante à descrita para *T. colubriformis*. (URQUHART *et al.*, 1990, p.27).

### 3.2 MECANISMOS NÃO IMUNOLÓGICOS QUE INTERFEREM NA MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA PARASITOSE

Além da resposta imune do hospedeiro, existem mecanismos que são capazes de regular a infecção parasitária. A competição intra ou interespecífica entre helmintos é uma delas. Em ovinos, a presença de grande quantidade de nematódeos gastrintestinais adultos pode retardar o estabelecimento larvário de parasitos da mesma espécie. A competição entre helmintos de espécies diferentes por nutrientes e *habitat* mútuos determina o número, a localização e a composição da fauna parasitária de um animal (TIZARD, 1998, p.333).

Em ovinos, o tipo de hemoglobina também está relacionado à resistência às parasitoses gastrintestinais. Existem três tipos de hemoglobina - A, B e AB – determinadas por herança monogênica, dialélica e sem dominância. Animais portadores do alelo A são capazes de responder mais rapidamente à anemia hemorrágica. Esta resposta se deve à síntese de um terceiro tipo de hemoglobina (hemoglobina C) pelas hemácias jovens. A hemoglobina C é produzida mais rapidamente que os demais tipos de hemoglobina, possibilitando rápida reposição de células na corrente sanguínea. Como o *Haemonchus contortus* é altamente hematófago, animais com uma hematopoese mais eficaz resistem mais à parasitose (MOREIRA *et al.*, 1982, p. 13-17).

### 3.3 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DE DEFESA

#### 3.3.1 O reconhecimento antigênico

Assim como nas outras regiões do corpo, há no trato digestório uma série de elementos que constituem a primeira linha de defesa ou imunidade inata do organismo. Dentre eles estão: o pH do suco gástrico e intestinal, a presença de epitélio intacto, a ativação do complemento pela via alternativa e a ação de células fagocíticas (TIZARD, 1998, p.4).

Para a manifestação de uma imunidade específica, é necessário que ocorra uma série de efeitos em cascata. O antígeno parasitário, presente no lúmen intestinal, é capturado por células epiteliais especializadas (células M) adjacentes às placas de Peyer. Neste local, o antígeno é processado por células apresentadoras de antígenos (macrófagos subepiteliais ou células dendríticas) e apresentado às células T (McCLURE e EMMERY, 1994, p.214), no contexto do MHC de classe II. Em resposta ao antígeno reconhecido, as células T auxiliares ( $CD4^+$ ) secretam interleucinas responsáveis por sua própria ativação e pelo estímulo de linfócitos B. Células B e T estimuladas na mucosa migram para os linfonodos regionais através dos vasos linfáticos aferentes, onde realizam a expansão clonal. Após proliferação e diferenciação, células B e T de memória circulam, via vasos linfáticos eferentes e sangue, rumo à lâmina própria do trato intestinal. Uma segunda infecção resulta em uma resposta local mais intensa, com produção de linfocinas, inflamação e proliferação celular (McCLURE e EMMERY, 1994, p.214).

Além das células T convencionais, portadoras do TCR do tipo  $\alpha\beta$ , também são encontradas células  $T\gamma\delta$  ( $T19^+/WC1^+$ ;  $CD4^-$ ;  $CD8^-$ ) na mucosa intestinal e na corrente sanguínea. Embora sua função exata não tenha sido estabelecida, imagina-se que essas células participem do processo de reconhecimento antigênico. A expressão do

marcador CD45RO indica que estas talvez sejam células de memória que recirculem seletivamente, de modo semelhante ao que ocorre com células CD4<sup>+</sup> (APÊNDICE I). É observado um decréscimo das células T $\gamma\delta$  e um aumento nas células CD4<sup>+</sup> com a idade (HOWARD e MORRISON, 1994, p.10). KAMBARA e McFARLANE (1996, p.127-135) observaram um aumento no número de células T19<sup>+</sup> em cordeiros de 2 a 6 meses de idade, quatro semanas após o início de um esquema de imunização semanal com larvas de *T. colubriformis*. Concomitante a este aumento, foi observado decréscimo no número de células CD4<sup>+</sup>. Efeito inverso entre essas subpopulações de células foi observado quando cordeiros de 8 a 13 meses foram submetidos ao mesmo esquema de imunização. Isso indica um possível envolvimento das células T $\gamma\delta$  no processo de reconhecimento do antígeno parasitário, sobretudo em animais jovens.

Apesar da resposta imune anti-helminto ter sido mais estudada em nível intestinal, alguns achados indicam ocorrer mecanismos semelhantes na mucosa gástrica. Nos primeiros 3-4 dias pós infecção com *Ostertagia* pode ser observado aumento de volume dos linfonodos que drenam o abomaso, bem como o aumento de células B e T $\gamma\delta$  na mucosa. A medida que a resposta progride, pode-se observar maior desenvolvimento dos linfonodos, com proliferação de linfócitos B e T $\gamma\delta$ . A maioria destas células se mostra responsiva ao antígeno do parasito em testes *in vitro*. (GASBARRE, 1997, p.330).

### 3.3.2 Mecanismos efetores

O curso da resposta imune ao longo de uma infecção depende da ativação de mecanismos efetores. Esta ativação ocorre pela ação das citocinas, proteínas que agem como fatores de crescimento e diferenciação para células do sistema imune (TIZARD, 1998, p.524). As citocinas (APÊNDICE II) produzidas pelas células T auxiliares são as que definem os mecanismos de resposta.



Existem duas subpopulações de células T auxiliares, Th1 e Th2, distinguíveis pelo tipo de citocinas que elas produzem (TABELA 1). Esta diferenciação dos linfócitos CD4<sup>+</sup> foi descrita em camundongos. Em bovinos não é observada a existência destas duas subpopulações distintas (GASBARRE, 1997, p.343). Mas, quando a resposta se dirige contra um agente específico, o padrão de resposta é predominantemente Th1 ou Th2 (GASBARRE, 1997, p.331; TIZARD, 1998, p.124).

TABELA 1 – PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE AS POPULAÇÕES DE CÉLULAS T AUXILIADORAS (Th)

CARACTERÍSTICA	CÉLULA Th1	CÉLULA Th2
Secreção de IL-2	++	-
Secreção de IFN $\gamma$	++	-
Secreção de TNF $\alpha$	++	-
Secreção de TNF $\beta$	++	+
Secreção de CSF-GM	++	+
Secreção de IL-3	++	++
Secreção de IL-4	-	++
Secreção de IL-5	-	++
Secreção de IL-10	-	++
Secreção de IL-13	-	++
Mecanismos efetores	Citotoxicidade de células T Ativação de macrófagos Algumas respostas de IgG	Algumas respostas de IgG Produção de IgA Produção de IgE Quimiotaxia de eosinófilos Degranulação de mastócitos

FONTE: TIZARD, 1998, p.123.

Ainda não se sabe o mecanismo pelo qual um antígeno estimula células Th1 ou Th2 (MEEUSEN, 1999, p.264), mas há várias evidências de que os helmintos gastrintestinais de ruminantes induzam uma resposta Th2:

- 1) Aumento no número células CD4<sup>+</sup> na mucosa abomasal, 7 dias após infecção com 10.000 L<sub>3</sub> de *T. axei*, seguido por um aumento de eosinófilos e células IgE<sup>+</sup> sete dias após (PFEFFER *et al.*, 1996, p.765-773);

- 2) Aumento no número de eosinófilos no sangue periférico 14 dias após infecção com *T. axei* (PFEFFER *et al.*, 1996, p.765-773); de 15 a 21 dias após infecção com *Teladorsagia circumcincta* (STEAR *et al.*, 1995a, p.375-380); 18 a 25 dias após infecção com *N. battus* (WINTER *et al.*, 1997, p. 189-193); 28 a 42 dias após infecções com *T. colubriformis* (BUDDLE *et al.*, 1992, p.955-960);
- 3) Após uma infecção secundária com *T. circumcincta*, a eosinofilia periférica aparece mais rapidamente: de 7 a 14 dias após desafio (STEAR *et al.*, 1995a, p.375-380);
- 4) Animais selecionados para resistência à parasitose gastrointestinal apresentam maior número de eosinófilos no sangue periférico que animais susceptíveis quando desafiados (BUDDLE *et al.*, 1992, p.955-960; WOOLASTON *et al.*, 1996, p.123-126); bem como maior nível de anticorpos IgE (SHAW *et al.*, 1999) e IgG (DOUCH *et al.*, 1995; DOUCH *et al.*, 1996; BISSET *et al.*, 1996);
- 5) Correlação negativa entre o número de eosinófilos na mucosa e a quantidade de helmintos no trato gastrointestinal (STEAR *et al.*, 1995a, p.375-380 ; OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 2000, p. p.447-452);
- 6) Associação entre o aumento de leucócitos, eosinófilos e mastócitos nas vilosidades intestinais e a expulsão de *N. battus* adultos, cerca de 21 dias após infecção (WINTER *et al.*, 1997, p.189-192);
- 7) Maior número de leucócitos, eosinófilos e mastócitos na mucosa intestinal de cordeiros de linhagens resistentes aos helmintos, sendo todas estas variáveis correlacionadas negativamente com a carga parasitária (BISSET *et al.*, 1996, p. 249-263);
- 8) Correlação negativa entre o número de mastócitos na mucosa abomasal e o número de ovos por fêmea de *H. contortus* (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 2000, p. p.447-452);

- 9) Aumento na concentração de IgE total sérica, 9 dias após início de um regime semanal de infecções com *T. axei*, permanecendo elevada por até 38 dias (SHAW *et al.*, 1997, p.253-265);
- 10) Pico de anticorpos IgE específicos anti-*T. colubriformis* (SHAW *et al.*, 1998, p.293-302) ou *H. contortus* (KOOYMANN *et al.*, 1997, p.403-405) cerca de 21 dias após infecção primária;
- 11) Pico de IgE total e específica entre 15 e 21 dias após desafio com *T. colubriformis* (SHAW *et al.*, 1998, p.293-302) e *H. contortus* (KOOYMANN *et al.*, 1997, p.403-405);
- 12) Correlação negativa entre o nível de IgE total sérica e o número de *H. contortus* no abomaso de animais infectados (KOOYMANN *et al.*, 1997, p.403-405);
- 13) Presença de altos títulos de IgG<sub>1</sub> e IgM a partir de 21 e 35 dias pós infecção com *T. colubriformis* (DOUCH *et al.* 1994, p. 921-928);
- 14) Aumento na concentração de IgG sérica anti-helminto, de 18 a 21 dias após início de um regime semanal de infecções com *T. axei* (PFEFFER *et al.*, 1996, p.765-773);
- 15) Presença de grande número de células IgM, IgG<sub>1</sub> e IgA na mucosa abomasal de 7 a 21 dias após desafio com larvas de *Haemonchus contortus* (GILL *et al.*, 1992, p.179-187);

O principal mecanismo efetor induzido pelas células Th2 é a reação anafilática (hipersensibilidade do tipo I), mediada pelos mastócitos da mucosa. Estes são capazes de proliferar em resposta à IL-3 e à IL-4, produzidas pelas células Th2. A produção de IL-4 também age sobre as células B, promovendo a síntese de cadeia pesada  $\epsilon$ . Desta forma, há intensa liberação de IgE pelos plasmócitos. Havendo IgE no meio, esta se liga fortemente aos receptores RFc $\epsilon$ I dos mastócitos. Quando ocorre o reconhecimento do antígeno parasito-específico pela porção Fab da IgE aderida à membrana, iniciam-

se rápidas modificações celulares no mastócito. Estas modificações levam à exocitose do conteúdo granular em até 60 segundos pós exposição ao antígeno.

Os grânulos dos mastócitos são ricos em histamina, serotonina, tripsina, proteases neutras, leucotrienos e bradicininas. Estes fatores em conjunto alteram a permeabilidade capilar, permitindo maior fluxo de macromoléculas para os tecidos (TIZARD, 1998, 364). A histamina tem um papel muito importante no estímulo da secreção de muco pelas células do epitélio intestinal e no aumento do peristaltismo (McCLURE e EMMERY, 1994, p.220-221).

A reação de hipersensibilidade específica, como acima descrita, é responsável pelo fenômeno de expulsão rápida (McCLURE e EMMERY, 1994, p.220; TIZARD, 1998, p.334-335).

Os grânulos dos mastócitos também liberam várias citocinas (IL-5, IL-4, IL-6, IL-13 e FNT $\alpha$ ), fator de agregação plaquetária (FAP) e dois tetrapeptídeos conhecidos como fatores quimiotáticos dos eosinófilos e da anafilaxia (FQEA). Estes fatores respondem em parte pela eosinofilia tão característica das parasitoses.

Os eosinófilos têm sua produção estimulada na medula sob influência da IL-3 e da IL-5, produzidas pelas células Th2 e mastócitos. Consequentemente, respostas imunes intermediadas por Th2 mobilizam os eosinófilos ao mesmo tempo que estimulam a produção de IgE. A atração dos eosinófilos para locais de degranulação mastocítica é estimulada pelos FQEA, leucotrieno B<sub>4</sub>, histamina, FAP, extratos de helmintos, C5<sub>a</sub> e produto de desdobramento da histamina a ácido imidazoleacético. Os três primeiros fatores também tem função de estimular a atividade eosinofílica (TIZARD, 1998, 335-336).

O mecanismo de ação mais eficaz do eosinófilo sobre os helmintos é a citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC). A ligação a parasitos ou moléculas revestidas por IgE (principalmente), IgA ou IgG desencadeia a liberação do conteúdo granular eosinofílico (TIZARD, 1998, 335-336; ABBAS *et al.*, 2000, p.57-58). A proteína básica principal (MBP) do centro cristalóide do eosinófilo é a principal

responsável pela lesão no tegumento dos parasitos. A MBP não é específica para determinado alvo, mas como ela fica confinada a um pequeno espaço entre o eosinófilo e o parasito, não afeta as células do hospedeiro. O eosinófilo também pode eliminar seu conteúdo granular ou realizar fagocitose em pequena escala (ROIT *et al*, 1999, p. 247).

Além da IgE, também são produzidos IgG e IgA. Os anticorpos produzidos podem ser específicos contra enzimas, produtos de secreção e excreção, ou cutícula de cada estágio de desenvolvimento. Seus principais mecanismos efetores são a ADCC e a ativação do complemento pela via clássica (WAKELIN, 1996, p.129-130; TIZARD, 1998, p.334-335; ROIT *et al.*, 1999, p.254). O primeiro é um fenômeno específico, no qual macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e plaquetas reconhecem a porção Fc da IgE, IgA ou IgG aderida ao antígeno e secretam substâncias que promovam a lise do mesmo (TIZARD, 1998, p.334-335; ROIT, 1999, p.254). A via de ADCC mais importante na resposta contra os helmintos é a que ocorre quando a IgE se liga ao receptor de alta afinidade (FcεRI) nos eosinófilos (ABBAS *et al.*, 2000, p.57-58). A ativação do complemento pela via clássica pode propiciar a neutralização das enzimas proteolíticas, bloqueio dos poros oral, anal e excretor do parasito por depósito de complexos imunes; prevenção da ecdise e do desenvolvimento; bloqueio na ovoposição e da formação de estruturas anatômicas (WAKELIN, 1996, p.129-130; TIZARD, 1998, p.334-335; ROIT *et al*, 1999, p.254).

O principal mecanismo efetor ativado pelas citocinas produzidas por células Th1 é a hipersensibilidade do tipo retardado (hipersensibilidade tipo IV ou DTH). Esta resposta geralmente é dirigida contra patógenos intracelulares, capazes de serem destruídos pela ação dos metabólitos do oxigênio e enzimas liberadas pelos macrófagos. As principais células efetoras são os macrófagos e as células T citotóxicas, ativados e recrutados para o local da infecção pelas citocinas liberadas por linfócitos Th1. Infecções bacterianas persistentes, como a causada por *Mycobacterium*

*tuberculosis*, causam intensa ativação das células de defesa, resultando em dano tissular e formação de granuloma, como resultado da DTH (TIZARD, 1998, p. 397-399).

A ativação de respostas Th1 contra helmintos gastrintestinais em ruminantes é controversa. ALMERIA *et al.* (1997, p.1051-1055) observaram um aumento na produção tanto de IL-4 quanto de IFN $\gamma$  por linfócitos da lâmina própria da mucosa de bezerros infectados com *O. ostertagi*. Outro indício da ocorrência da DTH é a formação de granulomas, induzidos por estádios larvais de algumas espécies de parasitos. Contudo, a presença de eosinófilos nestas lesões é característica, indicando que é necessária a ativação concomitante de células Th2 para resolução da infecção (MEEUREN, 1999, p.266). Esses dados levam à hipótese de que a resposta à verminose gastrintestinal não seja restrita à ativação de células Th2.

### 3.4 CARACTERÍSTICAS DA IMUNIDADE PARASITÁRIA

Infecções por nematóides gastrintestinais são crônicas, com imunidade completa contra todos os estádios parasitários demorando alguns meses para se tornar efetiva (McCLURE e EMMERY, 1994, p.215; GASBARRE, 1997, p.329). Há quatro principais efeitos da imunidade adquirida aos parasitos (McCLURE e EMMERY, 1994, p.215):

#### a) Rejeição das larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>)

A “expulsão rápida” das L<sub>3</sub> pode ser responsável pela remoção de uma nova carga de larvas infectantes de *H. contortus*, trinta minutos após inoculação no abomaso de animais imunes. O mesmo ocorre com larvas de *T. colubriformis*, que são expulsas de todos os 15 metros de intestino delgado, quatro horas após inoculação no piloro (McCLURE e EMMERY, 1994, p.220).

Essa resposta é característica de animais previamente imunizados. Em uma primo-infecção, aproximadamente 70% das L3 de *T. colubriformis* se desenvolvem. Após desafio contínuo por 5 a 6 semanas, a percentagem de desenvolvimento parasitário é diminuído para menos de 5% (DOBSON *et al.* *apud* McCLURE e EMMERY, 1994, p.215).

- b) Retardo do desenvolvimento larvário (aumento do período pré-patente da infecção)

Este fator é citado por ISRAF *et al.* (1997, p. 39-52) como a principal forma de manifestação da imunidade adquirida em animais previamente infectados com *N. battus*.

- c) Diminuição da fertilidade dos parasitos adultos (diminuição de postura de ovos e do comprimento das fêmeas parasitas)

Quanto às medidas de fecundidade das fêmeas parasitas, STEAR *et al.* (1995b, p.643-652) observaram uma alta correlação ( $r = 0,97$ ) entre o comprimento das fêmeas de *Teladorsagia circumcincta* e o número de ovos no interior de seu útero. Cordeiros que apresentaram fêmeas de parasitos mais curtas (menos prolíficas) apresentaram maiores títulos de IgA, maior número de eosinófilos e leucócitos na mucosa abomasal que cordeiros que apresentaram fêmeas mais longas de *T. circumcincta*. Para *H. contortus*, também foi observado correlação positiva entre comprimento das fêmeas e número de ovos em seu útero. Essas duas variáveis foram correlacionadas negativamente com o número de mastócitos na mucosa (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 2000, p. p.447-452). GÓMEZ-MUÑOZ *et al.* (1998, p. 449-459) também observaram fêmeas de *H. contortus* mais curtas em cordeiros *Manchego* previamente imunizados. GASBARRE (1997, p.339) relata a possibilidade de alterações morfológicas como o não

desenvolvimento do processo vulvar em fêmeas de *T. circumcincta* em bovinos previamente sensibilizados com o parasito. Estes achados sugerem a interferência da imunidade adquirida na função sexual dos parasitos, o que resulta em menor ovoposição.

Outro fator que pode implicar em uma menor eliminação de ovos de helmintos é a diminuição do número de fêmeas. ISRAF *et al.* (1997, p. 39-52) observaram uma maior proporção macho/fêmea em animais previamente imunizados contra *N. battus*.

Vários autores mostraram a diminuição de opg à medida em que aparece a resposta imune nos animais infectados, mesmo quando o número total de parasitos não é alterado. Já foi observada a correlação negativa do opg com os níveis séricos de IgE (SHAW *et al.*, 1998, p.293-302) e com o número de eosinófilos circulantes (DORCHIES *et al.*, 1997, p. 728-729). Na maioria dos casos, esta situação ocorre em respostas primárias. Em respostas secundárias, o fenômeno de expulsão rápida das L<sub>3</sub> parece ser o principal mecanismo efetor (SHAW *et al.*, 1998, p.293-302).

#### d) Expulsão de parasitos adultos ou fenômeno de auto cura

A expulsão rápida de parasitos adultos, ou “auto-cura”, é caracterizada pela eliminação de uma carga de parasitos adultos estabelecidos no trato gastrointestinal. Ocorre após desafio do hospedeiro com um grande número de larvas infectantes (STOLL, 1929, p. 384-418). WINTER *et al.* (1997, p.189-193) observaram que cordeiros com 2 meses de idade já são capazes de montar uma resposta imune do tipo expulsão rápida após uma única infecção com *N. battus*. Neste experimento, a maior parte dos helmintos adultos foi eliminada a partir de 21 dias após a infecção. Uma característica da “auto-cura” é que os animais permanecem refratários à infecção por helmintos por um certo período de tempo (WAKELIN, 1996, p.130).



De uma forma geral, os mecanismos protetores parecem ser dirigidos contra os estádios larvais. Mesmo uma alteração morfológica ou funcional do parasito adulto pode ser resultado de um ambiente adverso durante o seu desenvolvimento (GASBARRE, 1997, p. 339). Contudo, é necessário que o parasito desenvolva completamente seu ciclo biológico para estimular uma imunidade protetora no hospedeiro. McCLURE *et al.* (1998, p.739-476) observaram que infecções abreviadas por tratamento anti-helmíntico no estágio L<sub>4</sub> não resultam em proteção contra *T. colubriformis*. É possível que os helmintos adultos sejam importantes no estímulo às respostas imunes locais (GASBARRE, 1997, p. 337).

### 3.5 FATORES RELACIONADOS AO HOSPEDEIRO QUE PODEM INFLUENCIAR A RESPOSTA IMUNE

Existem diversos fatores relacionados ao hospedeiro que podem influenciar o número de parasitos encontrados, como o sexo, a espécie, a raça, a idade, a nutrição e a frequência de exposição ao antígeno parasitário.

É descrita na literatura uma maior susceptibilidade das fêmeas ovinas aos parasitos no período entre o parto e o desmame dos cordeiros. Este fenômeno é conhecido como “fenômeno pós-puerperal” e é um dos principais responsáveis pela contaminação da pastagem próximo ao desmame, possibilitando a infecção dos cordeiros (NARI e CARDOZO, 1987, p.18-20). Não está estabelecido se a supressão da imunidade nas ovelhas em lactação é ocasionada pelo estresse do parto, ação hormonal, balanço energético e protéico desfavorável ou fatores climatológicos. É bem possível que todos estes fatores atuem conjuntamente (HOUDLIK *et al.*, 2000, p.44).

A espécie e a raça do hospedeiro também podem interferir na severidade da parasitose. Tanto bovinos quanto ovinos podem ser parasitados por *Haemonchus*

*contortus*, mas os primeiros tendem a desenvolver menor carga deste parasito (NARI e CARDOZO, 1987, p.12).

Diversos trabalhos foram conduzidos afim de comparar a susceptibilidade de ovinos de diferentes raças à verminose gastrointestinal. Em geral, uma raça especializada na produção de carne ou lã é comparada com raças nativas, em especial africanas (BAKER, 1996, p.172-176; MUGAMBI *et al.*, 1997, p.265-273) ou norte-americanas (BAHIRATHAN *et al.*, 1996, p.259-268; BAKER, 1996, p.173; MILLER *et al.*, 1998, p. 55-74; AMARANTE *et al.*, 1999a, p. 311-324; AMARANTE *et al.*, 1999b, 61-69). Os animais nativos se mostraram mais resistentes às parasitoses que os animais exóticos, o que pode ser atribuído à seleção natural que estas raças têm sofrido ao longo do tempo (BAKER, 1996, p.173).

A literatura brasileira é deficiente em trabalhos que comparem a susceptibilidade de raças brasileiras e estrangeiras à parasitose. McMANUS e MIRANDA (1997, p.1055-1059) consideraram as ovelhas Santa Inês mais resistentes às helmintoses que ovelhas Bergamácia (tipo leite). No estado do Paraná, MORAES *et al.* (2001, p.58) mostraram que ovelhas Santa Inês eliminam menor número de ovos de helmintos que animais da raça *Suffolk*, mesmo quando criados conjuntamente em sistema intensivo. É bem possível que, tal qual outras raças nativas tropicais, os ovinos deslanados do Nordeste tenham sido naturalmente selecionados para a resistência.

A idade do hospedeiro é outro fator que pode interferir na resposta imune. Aparentemente, a imunidade aos parasitos gastrintestinais começa a se desenvolver quando os cordeiros têm cerca de seis meses de idade (NARI e CARDOZO, 1987, p.21; McCLURE e EMMERY, 1994, p.216). KAMBARA e Mc FARLANE (1996, p. 127-135) observaram que cordeiros de dois a seis meses e meio idade apresentaram menor número de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD5<sup>+</sup> no sangue periférico e na linfa intestinal após infecção e desafio com larvas de *T. colubriformis* do que cordeiros com idade entre 8 e 13 meses.

Apesar de os cordeiros responderem semelhantemente à infecção por vários gêneros de tricostrongilídeos, a resposta contra *Nematodirus* spp. parece ser uma exceção. Animais de 2 a 3 meses de idade já conseguem montar uma resposta imune protetora contra *N. battus* (ISRAF *et al.* 1997, p.39-52), mesmo quando submetidos a uma única infecção (WINTER *et al.*, 1997, p. 189-193). Esta resposta pode ser constatada pela redução da carga parasitária, pelo número de eosinófilos no sangue periférico, de mastócitos e eosinófilos na mucosa intestinal, e pelo nível de anticorpos específicos no soro, entre 21 e 28 dias após a infecção (WINTER *et al.*, 1997, p. 189-193).

O fator nutricional também é responsável pela modulação da resposta imune. KAMBARA e McFARLANE (1996, p.127-135) observaram uma maior porcentagem de células CD4<sup>+</sup>, no sangue de cordeiros de 8 a 13 meses de idade, e de T19<sup>+</sup>, em cordeiros de 2 a 6 meses, quando submetidos à imunização com larvas de *T. colubriformis* e a um regime nutricional de alta proteína. Animais de ambas as idades que receberam uma dieta menos protéica tenderam a apresentar maior porcentagem de células CD8<sup>+</sup> durante a imunização.

É bem possível que a expressão da imunidade aos parasitos gastrintestinais concorra com outras funções corporais quando os nutrientes são escassos. Os animais tendem a priorizar a manutenção das proteínas corporais, a fim de assegurar a sobrevivência em um curto espaço de tempo. O crescimento e a reprodução tomam um segundo plano, a fim de assegurar a sobrevivência da espécie. Evolutivamente, a manifestação da imunidade adquirida apresentaria uma prioridade baixa quando a nutrição do animal é inadequada. HOUDJIK *et al.* (2000, p.43-62) observaram que ovelhas que receberam ração com alto valor protéico na gestação e baixo na lactação mantêm os níveis de pepsinogênio e albumina séricos, mas não a resposta imune à *Teladorsagia circumcincta*, quando comparadas com ovelhas que receberam alto nível protéico durante todo o experimento. Isto indica que a estratégia nutricional é priorizar a manutenção da proteína corporal em detrimento da resposta imune.

A frequência de exposição do hospedeiro ao antígeno parasitário pode ser responsável pela velocidade de manifestação da resposta imune. Em geral, animais adultos em pastejo recebem uma carga parasitária capaz de manter o nível de imunidade protetora. Quando algum fator priva o hospedeiro da exposição contínua ao parasito, ocorre uma hiporesponsividade a um desafio subsequente. SUTHERLAND *et al.* (1999, p. 261-271) observou uma diminuição na capacidade de resposta a um desafio com 20.000 L<sub>3</sub> de *T. colubriformis* em borregos que receberam *bolus* de liberação lenta de benzimidazol. Como o dispositivo libera continuamente o princípio ativo por até 98 dias, o estabelecimento de uma população parasita susceptível à droga fica impossibilitada durante este período, diminuindo o estímulo antigênico.

### 3.6 EVASÃO DA RESPOSTA IMUNE POR PARTE DOS HELMINTOS

Embora as seções precedentes tenham destacado vários mecanismos pelos quais os hospedeiros resistem às parasitoses, estas repostas não são totalmente efetivas. Um parasito deve ser capaz de realizar suas funções vitais normalmente, mesmo em hospedeiros imunocompetentes. Ao longo dos anos, a seleção natural favoreceu parasitos que pudessem se desenvolver e reproduzir de maneira eficaz, por meio de mecanismos de escape à resposta imune de um hospedeiro específico.

Um destes mecanismos é a variação de antígeno de superfície nos nematódeos, por meio de várias mudas de cutícula durante o seu desenvolvimento. Esta estratégia dificulta a ação de anticorpos específicos. Quando a resposta imune contra um determinado estágio se torna completa, o parasito já evoluiu (TIZARD, 1998, p.338).

Há diversos parasitos capazes de secretar substâncias que inibam determinada fase da resposta imune, causando imunossupressão específica ou inespecífica. Infecções com *Ostertagia ostertagi* e *Trichostrongylus axei* resultam em depressão das respostas blastogênicas linfocíticas em bezerros (TIZARD, 1998, p.338). GASBARRE (1997,

p.333) sugere que um dos mecanismos de imunossupressão em infecções por *Ostertagia ostertagi* em bovinos seria a ativação policlonal de células B, com produção inespecífica de anticorpos. A superprodução de IgE não específica seria benéfica ao parasito por saturar os receptores de alta afinidade dos mastócitos (FcεRI), impedindo a liberação dos mediadores específicos dos mastócitos; por evitar a ADCC específica ao ocupar os receptores FcεRII<sub>a</sub> dos eosinófilos e por inibir a proliferação de células T ao ocupar os receptores FcεRII<sub>b</sub> das células B (PRITCHARD *et al.*, 1993 *apud* KOOYMANN, 1997, p.405).

Outro mecanismo de defesa dos helmintos é a indução à tolerância imunológica do hospedeiro. Isto ocorre quando animais muito jovens recebem uma boa carga de parasitos. Em modelos experimentais, nos quais ratos são infectados por *Nippostrongylus* antes de seis semanas de idade, o curso normal da resposta, com rápida expulsão dos parasitos, é suprimido. Possivelmente deva ocorrer um mecanismo semelhante em cordeiros submetidos a sub-cargas parasitárias durante o período de aleitamento à pasto (WAKELIN, 1996, p.140)

### 3.7 USO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS PARA A SELEÇÃO DE OVINOS GENETICAMENTE RESISTENTES À VERMINOSE GASTRINTESTINAL

Por muitos anos tem sido observado que uma população de helmintos não é distribuída uniformemente em uma população de hospedeiros. Enquanto a grande maioria dos indivíduos tende a apresentar um número relativamente baixo de parasitos, uma pequena parte da população concentra a maior carga parasitária. Em ovinos, distribuição semelhante é observada quanto ao efeito da verminose sobre o hospedeiro: enquanto a maior parte do rebanho apresenta-se hígida, um pequeno número de indivíduos está morrendo de haemoncose (BISSET *et al.*, 2001, p.2).

CALUNIES-ROSS (1932, p.73-80) foi o primeiro a observar que havia diferenças entre "resistência à infecção parasitária" e a "resistência aos efeitos da infecção". Atualmente, é definido como "resistência" a capacidade dos ovinos em impedir o estabelecimento e/ou subsequente desenvolvimento dos parasitos no trato gastrintestinal, e como "resiliência" a capacidade do ovino manter um nível produtivo aceitável quando parasitado (ALBERS *et al.*, 1987, p.1355). De uma forma geral, há uma forte tendência dos indivíduos mais resistentes serem também mais "resilientes" quando infectados por *Haemonchus contortus* (ALBERS *et al.*, 1987, p.1360; BISSET *et al.*, 2001, p.15-16). Considerando que o grau de anemia do hospedeiro seja uma medida de "resiliência" ao *H. contortus*, os resultados de SOTOMAIOR (1997, p.61-69) e SCHMIDT *et al.* (2001, p.63) confirmam que esta tendência também seja verdadeira para os ovinos dos rebanhos paranaenses, quando submetidos à infecção natural.

Com o desenvolvimento de cepas de parasitos resistentes a vários princípios ativos, a seleção de ovinos resistentes às parasitoses parece ser uma alternativa de controle da verminose gastrintestinal em muitos rebanhos. Para que a seleção individual seja possível, é necessário a escolha de um caracter fenotípico que reflita o comportamento do animal perante a verminose. Estes caracteres podem ser chamados de marcadores de animais resistentes. Um marcador ideal deve apresentar boa repetibilidade, baixo custo e uma análise automatizada; as amostras (de sangue ou fezes) devem ser de fácil obtenção e passíveis de serem estocadas o maior tempo possível (DOUCH *et al.*, 1996, p.902).

O marcador mais utilizado para "medir" a resistência de um animal à parasitose é o número de ovos de helmintos por grama de fezes (opg), por ser altamente correlacionado com a contagem de parasitos adultos presentes no trato gastrintestinal do hospedeiro (DOUCH *et al.*, 1996, p.902). Para a seleção de ovinos resistentes, este caracter é mensurado após uma infecção experimental com larvas do parasito mais importante na região (WOOLASTON *et al.*, 1990, p.1015) ou após picos de infecção natural em nível de campo (MORRIS *et al.*, 1997, p.319-329;

SOTOMAIOR, 1997, p.61-69; SCHMIDT *et al.*, 2001, p.63). A herdabilidade do opg é estimada entre 0,20 a 0,42, valores semelhantes aos de outras características produtivas (DOUCH *et al.*, 1996, p.905).

O cruzamento seletivo de ovinos de baixo e de alto opg possibilitaram, respectivamente, a formação de linhas de animais resistentes e susceptíveis à verminose gastrointestinal (WOOLASTON *et al.*, 1990, p.1015; MORRIS *et al.*, 1997, p.319-329). A diferença na média de opg entre cordeiros de linhas divergentes, selecionados desde 1979 no AgResearch-Wallaceville Animal Research Centre, Nova Zelândia, é maior que 35 vezes, quando os animais pastejam em áreas comuns (BISSET, MORRIS, McEWAN e VLASSOFF, comunicação pessoal).

Algumas limitações do uso do opg como marcador de ovinos resistentes ao parasitismo são: (1) a necessidade de deixar os animais por longos períodos sem tratamento anti-helmíntico, o que pode levar a perdas produtivas e até mesmo à morte de alguns animais; (2) impossibilidade de estocar as amostras por longos períodos e (3) não automação do método de contagem (DOUCH *et al.*, 1996, p.902).

Uma vez que a resistência à verminose gastrointestinal é decorrente de uma resposta imune adquirida (GILL, 1991, p.625), alguns trabalhos sugerem o emprego de marcadores imunológicos como alternativa ou complemento ao opg (DOUCH *et al.*, 1996, p.902). Como os marcadores imunológicos são correlacionados negativamente com o opg, animais de maior resposta ("*high responders*") seriam os de menor opg (resistentes).

O número de eosinófilos no sangue periférico é uma característica que tem sido estudada como marcador imunológico de animais resistentes. SOTOMAIOR (1997, p.98) encontrou diferenças no número de eosinófilos periféricos em ovelhas resistentes e susceptíveis, mas o mesmo não foi verificado para cordeiros. WOOLASTON *et al.* (1996, p.124-125) encontrou diferenças significativas na contagem de eosinófilos no sangue de animais de linhagens resistentes e susceptíveis aos 13 meses de idade. Os mesmos autores estimaram uma herdabilidade de 0,19 para este caráter e de 0,40 para

o opg. A correlação genética entre esses parâmetros foi de  $-0,62$ . DOUCH, *et al.* (1996, p.903-904) revisaram uma série de trabalhos com dados controversos sobre o uso deste caráter, afirmando que nem sempre o número de eosinófilos no sangue periférico reflete a contagem de células na mucosa.

Com a obtenção de anticorpos monoclonais e o desenvolvimento de técnicas sensíveis para a pesquisa de anticorpos séricos, como o enzima-imunoensaio, foram desenvolvidos vários trabalhos a fim de pesquisar o nível de anticorpos específicos em animais resistentes e susceptíveis (DOUCH *et al.*, 1994, p. 921-928; STEAR *et al.*, 1995b, p. 643-652; DOUCH *et al.*, 1995, p. 121-132; PFEFER *et al.*, 1996, p. 765-773). Segundo DOUCH *et al.* (1996, p.904), o tipo de anticorpo a ser mensurado depende do tempo após infecção. Respostas primárias incitam um título maior de IgM e IgG<sub>1</sub>, enquanto que em infecções secundárias e crônicas a IgG<sub>1</sub> predomina. IgG<sub>2</sub> e IgA específica estão presentes em níveis mais baixos. Portanto, a mensuração da IgG<sub>1</sub> específica contra L<sub>3</sub> do parasito predominante na região seria mais indicada como marcador. A herdabilidade deste caracter foi estimada entre 0,37 a 0,56, e sua correlação genética com o opg em  $-0,88$  (DOUCH *et al.*, 1996, p.904).

Como a obtenção de mAbs contra IgE ovina é recente (SHAW *et al.*, 1996, p. 235-251 e KOOYMANN *et al.*, 1997, p. 395-406) poucos dados estão disponíveis a respeito de sua participação no fenômeno de resistência dos ovinos às parasitoses. SHAW *et al.* (1999, p. 25-32) foram os únicos a estudar diferenças na IgE total e específica em progênes de animais resistentes e susceptíveis. Estes autores estimaram que a herdabilidade da IgE anti-*T.colubriformis* seria de 0,36 a 0,52.

De uma forma geral, quando se objetiva iniciar um programa de seleção de ovinos resistentes às parasitoses, o melhorista pode optar por marcadores parasitológicos, hematológicos, imunológicos, crescimento após desafio com parasitos ou por uma combinação destes caracteres. A escolha do(s) marcador(es) depende das características do rebanho e dos recursos físicos e humanos do laboratório que fará as análises (DOUCH, *et al.*, 1996, p.901).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram acompanhados 20 ovelhas e 25 cordeiros pertencentes ao Quartel General do Exército da Quinta Região Militar, Curitiba, no período entre 06 de outubro de 1998 e 01 de junho de 1999. Todas as fêmeas eram mestiças *Suffolk* de vários graus de sangue, com idade de um a oito anos. Na estação de monta de 1998, todas as ovelhas foram cobertas com um macho *Suffolk*. Os cordeiros, produtos deste cruzamento, nasceram entre 22 de maio e 08 de agosto. O desmame de todos os cordeiros foi realizado conjuntamente, em 06 de outubro de 1998. No ano de 1999, as ovelhas foram deixadas com um macho *Hampshire Down* a partir do mês de janeiro.

Todos os animais permaneceram constantemente nas mesmas pastagens, sujeitos à infecção natural. As categorias de animais adultos e jovens pastejavam conjuntamente uma área de capim nativo, sobresemeada com azevém (*Lolium multiflorum*) no inverno. A lotação média era de seis animais por hectare. Os animais eram recolhidos para um aprisco, ao meio dia e durante a noite, onde era ofertado concentrado comercial. Água e sal mineral eram fornecidos *ad libitum* tanto nos piquetes quanto no aprisco.

### 4.2 CONTROLE PARASITÁRIO

Tanto ovelhas quanto cordeiros foram acompanhados por amostragem durante o período de lactação, por meio de exames coproparasitológicos, a fim de monitorar a carga parasitária antes do período de realização do trabalho.

As desverminações foram conduzidas de modo a diminuir a contaminação das pastagens pelos animais adultos e de obter o máximo de estímulo ao sistema imune dos animais jovens, porém sem debilitá-los. Após cada dosificação anti-helmíntica,

era realizada nova coleta de fezes para verificar a eficácia do medicamento (SOUZA, 1997, p.10-14).

Os animais também foram desverminados por ocasião do desmame (dia 06 de outubro) com 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de Moxidectin<sup>1</sup>. Esta dosificação teve como objetivo deixar os animais em condições semelhantes de parasitose para o acompanhamento, apesar de estarem com baixo OPG.

#### 4.3 COLHEITA DE FEZES

As fezes eram colhidas com sacos plásticos, diretamente do reto de cada animal. Depois de identificadas, as amostras eram acondicionadas em isopor com gelo e levadas ao laboratório, onde foram processados os exames parasitológicos (item 4.5).

Para as ovelhas adultas, as colheitas de fezes foram realizadas a cada 28 dias, no período de novembro de 1998 a maio de 1999. Para os cordeiros, as colheitas de fezes foram realizadas quinzenalmente, do desmame (outubro de 1998) a fevereiro de 1999, e mensalmente, de março a junho de 1999.

#### 4.4 COLHEITA DE SANGUE

As colheitas de sangue foram realizadas a partir do desmame, na mesma data das colheitas de fezes, sempre por volta das oito horas da manhã. O sangue era colhido da veia jugular externa, em tubos *vacuntainer*<sup>2</sup>, com capacidade para 4 ml e contendo EDTA como anticoagulante. Após a colheita, as amostras eram identificadas e levadas ao laboratório para a contagem de eosinófilos (item 4.6.1).

Mensalmente, eram colhidas amostras de sangue em tubos *vacuntainer* de 8ml, sem anticoagulante. Após a colheita, as amostras eram identificadas, postas inclinadas em caixas de transporte e levadas ao laboratório. Posteriormente, cada

---

<sup>1</sup> Cydectin® Cyanamid Química do Brasil Ltda.

<sup>2</sup> Vacuette® Greiner - Labortechnik

amostra era centrifugada para obtenção do soro. O soro de cada animal foi aliquoteado em tubos *ependorff* e mantidos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização do teste de enzima-imunoensaio (item 4.7).

#### 4.5 TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS

Para estimativa do opg (número de ovos de helmintos por grama de fezes), foi utilizada a técnica de GORDON e WHITLOCK (1939, p.50). Dois gramas de fezes de cada amostra eram pesados e diluídos em 58 ml de solução saturada de cloreto de sódio (APÊNDICE 3). A suspensão resultante era filtrada em tamis com gaze, homogeneizada, e utilizada para preencher os retículos da câmara de McMaster. Após dois minutos de espera, era procedida a leitura em microscópio óptico, no aumento de 100 vezes. O OPG era calculado com a seguinte fórmula:

$$\text{OPG} = \text{n.}^{\circ} \text{ de ovos de strongilídeos} \times 100$$

Também foi utilizado o método de WILLIS (1927, p. 375-376). Este é um método qualitativo, também fundamentado na flutuação de ovos de helmintos em solução saturada de cloreto de sódio. O emprego desta técnica teve por objetivo identificar animais positivos para ovos de cestóides e oocistos de protozoários. Uma vez que a pesquisa de ovos se dá a partir de uma maior quantidade de solução fecal que a analisada pelo método de GORDON e WHITLOCK (1939, p.50), a técnica qualitativa é mais sensível para a detecção de ovos leves de nematóides. Na tabulação dos dados, amostras negativas no exame quantitativo, mas positivas no qualitativo foram consideradas com 100 OPG.

A fim de identificar os gêneros de parasitos prevalentes em cada pico de parasitismo, foi realizada a coprocultura. Para isto, um *pool* de fezes de cada lote foi homogeneizado, umedecido e acrescido de cepilho. Cada *pool* foi incubado a  $18-25\text{ }^{\circ}\text{C}$

por 15 dias. As larvas foram recuperadas do cultivo pelo método de RUGAI *et al.* (1954, p.5-8) e identificadas com a chave proposta por UENO e GONÇALVES (1994, p.38-47).

#### 4.6 TÉCNICAS IMUNO-HEMATOLÓGICAS

##### 4.6.1 Contagem de eosinófilos

A contagem dos eosinófilos foi feita pelo método direto, segundo LIMA *et al.* (1985). Este método consiste na utilização de líquidos de diluição-coloração. Sua composição é baseada nas propriedades específicas de coloração das granulações eosinofílicas e na maior resistência dos eosinófilos à lise, em relação aos demais glóbulos sanguíneos.

O diluidor utilizado foi o de Pilot Modificado (MacFARLANE e CECIL, 1951, p. 1187), que cora somente os eosinófilos (por meio da eosina), lisa ou reduz a fragmentos os eritrócitos (por meio do propilenoglicol) e os leucócitos (por meio do carbonato de cálcio). A câmara de contagem utilizada foi a de Fucks-Rosenthal, por comportar maior volume (3,2 mm<sup>3</sup>). Após a diluição de 20 µl de cada amostra de sangue em 0,38 ml de diluidor, a mistura foi homogeneizada e utilizada para preenchimento da câmara. Esperou-se de 15 a 30 minutos para a leitura. Este tempo foi necessário para que os eosinófilos ficassem corados, se depositassem no fundo da câmara e para que ocorresse a lise dos demais elementos figurados do sangue. A leitura foi feita em microscópio óptico, no aumento de 400 vezes. As duas áreas reticuladas da câmara foram contadas. O cálculo do número de eosinófilos por mm<sup>3</sup> de sangue foi feito utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\text{Número de eosinófilos por mm}^3 = \frac{\text{média dos dois retículos} \times 20}{3,2}$$

$$3,2$$

## 4.7 TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS

Foi utilizado o método de enzima-imunoensaio para detecção dos níveis de anticorpos da classe IgG e IgE específicos contra *Haemonchus contortus* e quantificação do nível de IgE total. O enzima-imunoensaio foi escolhido entre as demais técnicas imunológicas por apresentar alta reprodutibilidade, fácil execução e permitir uma leitura automatizada das amostras.

O extrato protéico de *Haemonchus contortus* foi escolhido como antígeno para as provas de mensuração dos níveis de anticorpos específicos uma vez que esta espécie de helminto é a mais patogênica e uma das mais prevalentes no Estado do Paraná (MORAES *et al.* 1998, p. 427; OLIVEIRA *et al.* 1999, p.494). Apesar dos animais estarem sujeitos à infecção natural multi-específica, o nível de anticorpos anti-*Haemonchus* pode ser um indicativo da resposta humoral contra a carga parasitária total devido à existência de imunidade cruzada entre os tricostrongilídeos (CUQUERELLA *et al.*, 1994, p. 243-251; SCHALLIG *et al.*, 1995, p.329-338; BISSET *et al.*, 1996, p.249-263).

### 4.7.1 Enzima-imunoensaio indireto para detecção de anticorpos IgG anti-*Haemonchus contortus* (H.c.)

#### 4.7.1.1 Obtenção do antígeno

Para a obtenção do antígeno somático de *Haemonchus contortus* (H.c.), helmintos adultos desta espécie foram obtidos a partir de ovinos infectados natural ou experimentalmente e abatidos. No local de abate, o abomaso era ligado na extremidade cárdica e pilórica, separado das demais vísceras, acondicionado em isopor com gelo e levado ao laboratório.

No laboratório, o órgão era incisado longitudinalmente na curvatura menor. Os parasitos eram colhidos um a um e lavados sucessivas vezes em solução de cloreto de sódio a 0,9%. As lavagens tinham como objetivo livrar os helmintos da maior carga de contaminação. Todos os parasitos foram identificados individualmente em microscópio estereoscópico, a fim de se certificar da espécie, seu estágio de desenvolvimento e estado de autólise. Parasitos imaturos ou com a morfologia alterada por autólise foram descartados.

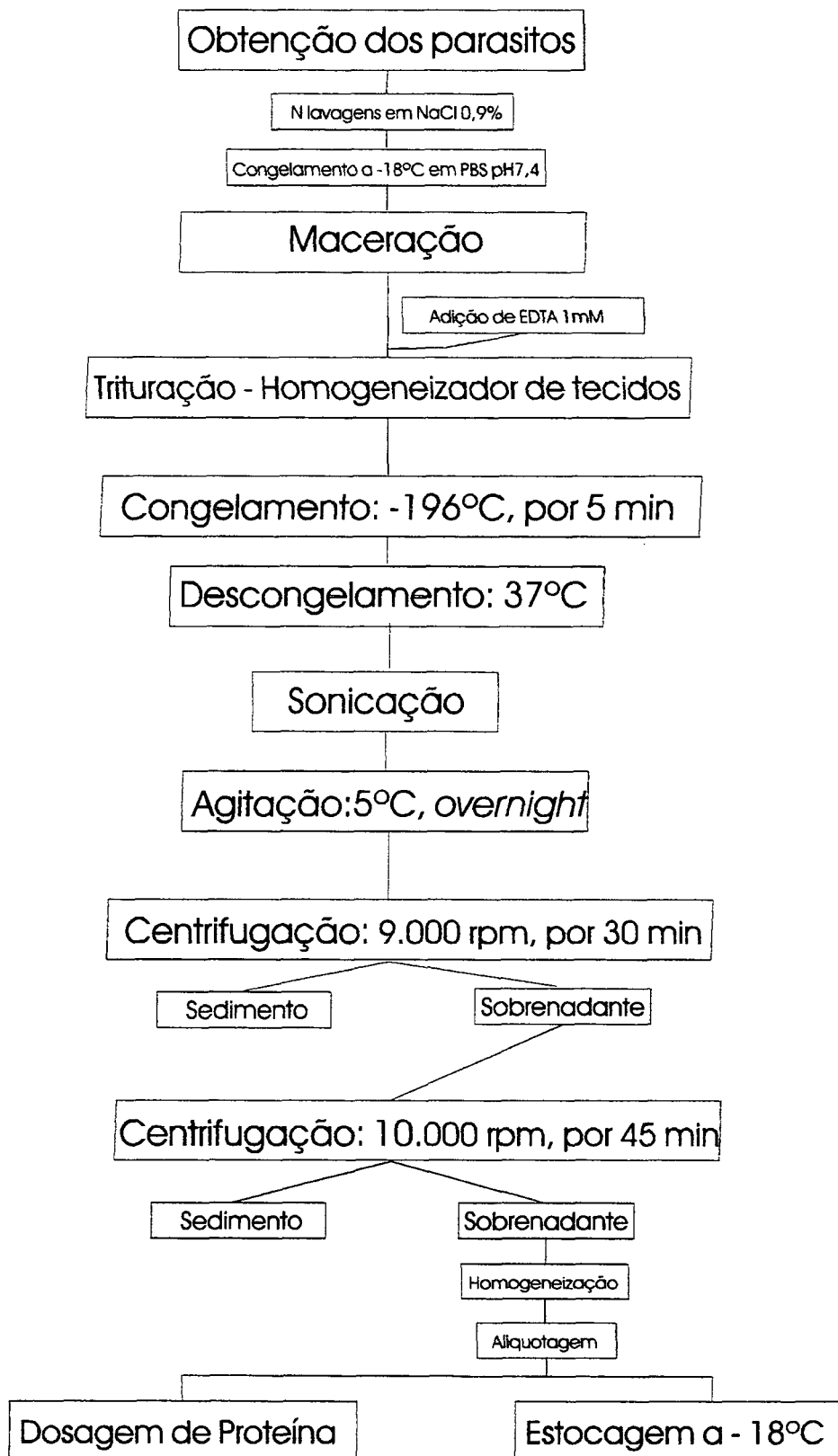
Cerca de 1.000 *H. contortus* adultos foram utilizados para produção do antígeno. Os parasitos obtidos em cada necropsia foram congelados em PBS 7,4. Posteriormente, todas as alíquotas foram descongeladas e fusionadas para extração do antígeno. A alíquota única foi, então, submetida à maceração mecânica em gral. Para evitar a lise das proteínas antigênicas por enzimas liberadas durante o processo de extração de proteínas, foi utilizado o EDTA como inibidor de proteinases. Por isso, uma solução de 1mM de EDTA foi acrescentada, volume a volume, aos helmintos enquanto macerados com o pistilo (FIGURA 2).

Para promover uma melhor lise cuticular e de estruturas internas dos parasitos, os mesmos foram triturados em homogeneizador de tecidos<sup>3</sup> (ciclos de 150 a 400 rpm) até que não se observasse macroscopicamente grandes fragmentos dos parasitos. O material resultante era congelado por cinco minutos em nitrogênio líquido. A seguir era realizado um descongelamento rápido em banho-maria a 37°C. Este ciclo de congelamento e descongelamento era repetido cinco vezes. A próxima etapa consistia em submeter o antígeno ao ultra-som (20 kHz, 1mA). Foram realizadas oito séries de 30 segundos, com intervalo de 30 segundos. Tanto os ciclos de congelamento e descongelamento quanto os de sonicação objetivam a ruptura celular, com liberação de proteínas citoplasmáticas.

---

<sup>3</sup> Potter S - Biotech International, 3.01-0699

FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOMÁTICO DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* (H.c)



A fim de proporcionar a solubilização das proteínas de membrana, o antígeno foi deixado sob agitação a 5 °C *overnight*. O material foi transferido para tubos cônicos gelados e submetidos à ultra-centrifugação a 9.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação a 10.000 rpm por 45 minutos. O sedimento resultante deste processo foi descartado, pois corresponde ao antígeno particulado, que não é utilizado no método de enzima-imunoensaio. O antígeno solúvel (sobrenadante) foi homogeneizado, aliquotado e estocado a -18 °C. Uma destas alíquotas foi submetida à dosagem de proteína.

Durante todo o procedimento para extração de proteínas, o material antigênico foi mantido em gelo picado. Esta medida objetiva evitar a lise do antígeno por proteinases presentes no meio, uma vez que a grande maioria destas enzimas tem sua atividade inibida em baixas temperaturas.

Para dosagem de proteína do antígeno foi utilizado o método de BRADFORD (1976, p.248-254). Seu princípio é baseado na existência de duas diferentes formas do Azul de Coomassie G-250, uma azul e outra vermelha. A forma vermelha é convertida em azul quando ligada a proteínas. Esta ligação é feita principalmente entre o corante e grupos amina livres de aminoácidos de cadeias laterais, especialmente a lisina (CAMPBELL, 1999, p.5).

Para execução desta técnica, foi preparado o reativo de Bradford (APÊNDICE 3). Quantidades crescentes de padrão albumina (2 µg; 6µg; 10 µg; 14 µg; 18 µg e 20 µg) e diferentes volumes do antígeno (10 e 50 µl) foram acrescentados em tubos de ensaio limpos. Para obter um volume constante de 100 µl por tubo, o volume inicial foi completado com água destilada. Cada concentração de antígeno ou de padrão foi pipetada em dois tubos, de modo a se obter uma duplicata de cada medida. O próximo passo consistiu na adição de 1 ml do reativo de Bradford por tubo. Cada amostra foi homogeneizada em vortex. Após dois minutos foi procedida a leitura em espectrofotômetro, com filtro de 595 nm. A DO de cada diluição de padrão foi anotada



e tabulada no Microsoft Excel 97 para a confecção da curva de albumina. Com base na fórmula desta curva e da DO das amostras de antígeno foi realizado o cálculo da concentração protéica do antígeno H.c. (ANEXO I).

#### 4.7.1.2 Soros controles

Para a padronização da técnica de enzima-imunoensaio e controle da variação entre placas foi necessário a obtenção de controles positivos e negativos para *Haemonchus contortus*.

##### a) Soros controles positivos

Os soros controles positivos utilizados foram amostras obtidas das ovelhas na colheita de 02 de março de 1999, imediatamente anterior ao pico de parasitismo do outono.

##### b) Soros controles negativos

Inicialmente, trabalhou-se com 15 amostras de soros pré-colostrais de cordeiros. A escolha foi baseada no princípio de que os cordeiros não tenham contacto com os helmintos gastrintestinais durante a vida intra-uterina. Além disto, a placenta dos ruminantes é do tipo epitélio-corial (SALISBURY *et al.*, 1978, p.158), que não permite a passagem de anticorpos maternos para o feto via placenta. Como a imunidade passiva é transferida para o cordeiro integralmente via colostro, o nível de imunoglobulinas presente no soro pré-colostral é praticamente nulo (TIZARD, 1998, p. 249).

As amostras foram colhidas no período de 22 de agosto a 7 de setembro de 2000, no Setor de Ovinocultura da Fazenda Experimental do Canguiri, Pinhais. As ovelhas eram acompanhadas em baía-maternidade durante o trabalho de parto, sendo realizadas intervenções obstétricas quando necessário. Somente quando a fêmea e o produto apresentavam-se em plenas condições, o cordeiro era separado para a colheita de sangue. Apenas cordeiros com peso acima da média esperada para sua raça foram utilizados. O sangue foi colhido da veia jugular externa, com seringa de 5 ml e agulha 25 X 5, após depilação e desinfecção do local de punção. Imediatamente após a colheita, o sangue era passado para tubo de ensaio estéril, onde permanecia até ser levado para o laboratório para centrifugação e obtenção do soro.

O segundo controle negativo foi obtido de dois cordeiros, tratados com anti-helmínticos e mantidos confinados desde o desmame. Estes animais também eram pertencentes ao Setor de Ovinocultura da Estação Experimental do Canguiri. Dois meses após o confinamento, cada um recebeu uma dose de Levamisol<sup>4</sup> (10 mg.kg<sup>-1</sup>). Quinze dias após esta dosificação, os animais receberam uma dose de Nitroxinil<sup>5</sup> (13 mg.kg<sup>-1</sup>). Dois meses após a primeira dosificação, foram colhidas as amostras de sangue, conforme descrito no item 4.4.

#### 4.7.1.3 Execução da técnica

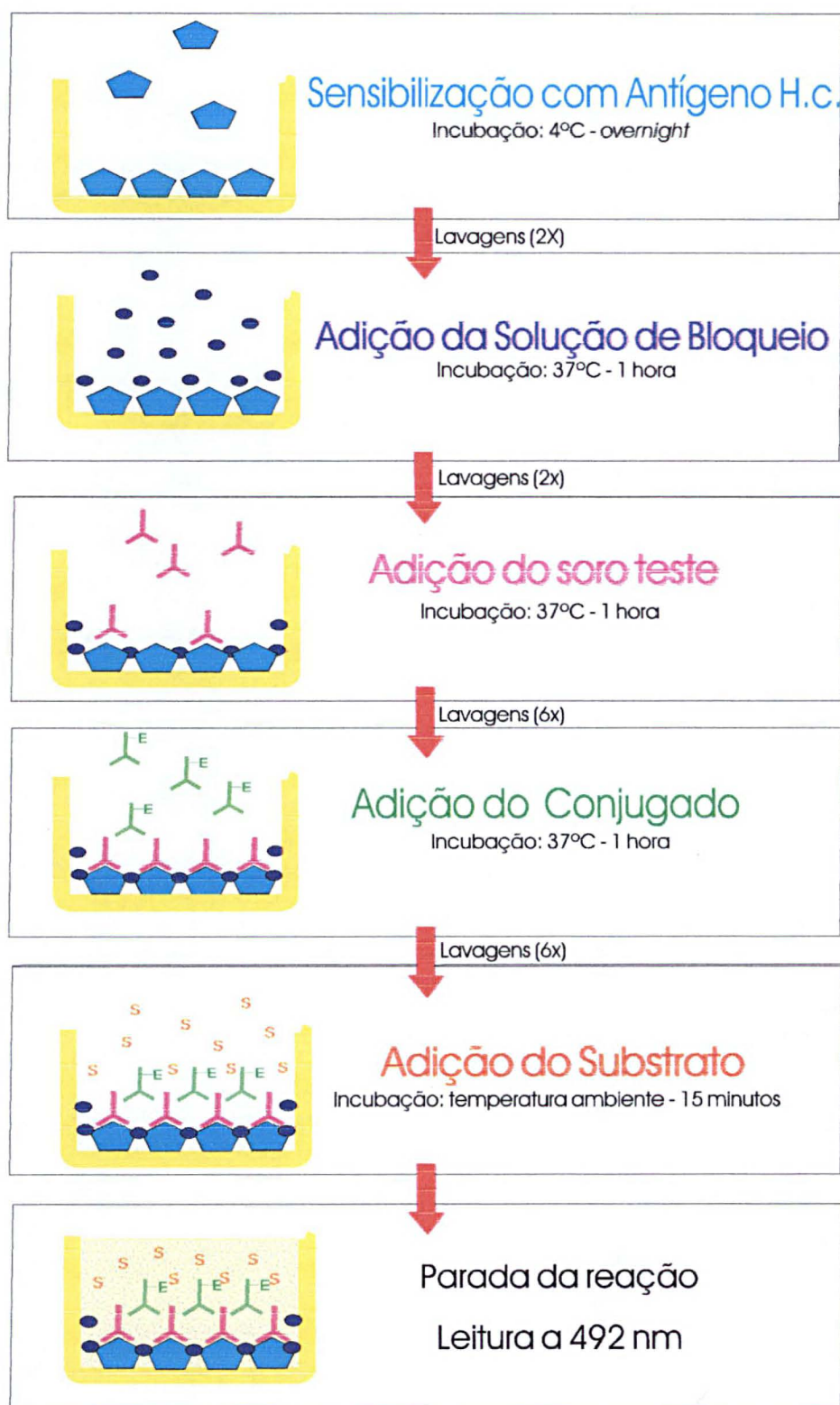
O teste de enzima-imunoensaio tem como princípio uma reação de cor. A coloração se faz presente quando a enzima peroxidase, integrante do conjugado, desdobra o substrato orto-fenileno-diamino (OPD). Para que haja manifestação de cor, é necessário que ocorram vários eventos em sequência. Esses eventos têm início com a sensibilização da placa com o antígeno e seguem até a aferição da cor pelo leitor de enzima-imunoensaio (FIGURA 3).

---

<sup>4</sup> Ripercol L 150 F ® - Cyanamid Química do Brasil - Levamisol 15%

<sup>5</sup> Dovenix ®34% - Laboratórios Merial - Uruguai

FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE ENZIMA-IMUNOENSAIO INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* (H.c.)



As placas de poliestireno<sup>6</sup> utilizadas tinham 96 poços com fundo em “U”, organizados em oito linhas e 12 colunas. O protocolo da técnica foi adaptado de MINOZZO (1997, p.39-45).

#### a) Sensibilização da placa

A primeira etapa do método de enzima-imunoensaio consiste na sensibilização da placa de poliestireno com a solução antigênica. Para isto, o antígeno H.c. foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 (APÊNDICE 3), até a concentração ótima determinada na padronização. Este tampão foi escolhido por apresentar melhores condições para adesão do antígeno de *Haemonchus contortus* à placa (SCHALLIG *et al.*, 1995, p.334). Por meio de uma pipeta multicanal, foi colocado 100 µl da solução antigênica em cada poço, exceto nos poços da primeira coluna da placa, utilizada para “zerar” o aparelho. Após adição do antígeno, a placa foi incubada *overnight* a 4-8 °C.

#### b) Primeira lavagem

Tem por objetivo remover o excesso de antígeno que não se fixou à placa. Para isto, cada poço foi preenchido com solução de lavagem (APÊNDICE 3). A seguir, a solução foi removida dos poços por meio de inversão manual da placa.

Este procedimento foi realizado duas vezes.

#### c) Bloqueio

Nem sempre a quantidade de antígeno depositada em cada poço consegue revesti-lo por completo. Portanto, é necessário a adição de outra proteína para preenchimento dos espaços. Esta proteína deve ser escolhida com cuidado, uma vez

---

<sup>6</sup> NUNC 167008

que ela não pode ser reconhecida por anticorpos presentes no soro teste. Caso isto ocorra, a densidade óptica (DO) da amostra é superestimada significativamente devido a reações anticorpo-bloqueio. Por outro lado, a não adição de uma proteína bloqueadora pode fazer com que anticorpos inespecíficos do soro se liguem à porção descoberta da placa, o que também superestimaria a DO do soro teste.

A solução de Bloqueio utilizada neste ensaio foi 2% de caseína bovina<sup>7</sup>, da qual 150 µl foi adicionado por poço. Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por uma hora. A caseína foi escolhida por ser uma proteína normalmente encontrada no leite e dificilmente exposta ao sistema imune animal como substância estranha.

#### d) Segunda lavagem

Tem por objetivo remover o excesso de caseína que não se fixou à placa. Procedeu-se de maneira semelhante à primeira lavagem.

#### e) Adição do soro teste

O soro teste era diluído em tampão de incubação (APÊNDICE 3), em quantidade definida na padronização da técnica. A fim de diminuir erro de pipetagem entre as amostras, foram empregadas duas diluições sucessivas até atingir a diluição padronizada. A seguir, 100 µl da diluição final da amostra era colocado em dois poços adjacentes (duplicata). Além dos soros-teste, uma amostra de soro controle positivo e uma de controle negativo eram adicionados a cada placa, a fim de controlar possíveis variações entre placas. Não foi adicionado nenhuma amostra de soro nos poços da primeira coluna da placa, uma vez que esta é utilizada para fazer o branco do aparelho.

Após os procedimentos anteriores, a placa era incubada a 37 °C por uma hora.

---

<sup>7</sup> SIGMA C7078

#### f) Terceira lavagem

Esta etapa tem por objetivo a remoção dos anticorpos que não se ligaram ao antígeno fixado na placa, bem como outras substâncias presentes no soro. Esta lavagem é mais minuciosa que as anteriores, visto que mesmo um pequeno resquício de soro pode alterar significativamente a DO da amostra. Assim, o procedimento de lavagem, descrito no item 4.7.1.1.2, foi repetido seis vezes, ao invés de apenas duas.

#### g) Adição do Conjugado

O conjugado é uma molécula protéica marcada com uma enzima. Neste estudo, foi utilizado anticorpos monoclonais, obtidos a partir de células de asininos imunizados contra IgG ovina e marcados com a enzima peroxidase<sup>8</sup>. Da mesma forma que para o antígeno e o soro, a diluição ideal do conjugado foi obtida por meio de vários testes para padronização da técnica. A quantidade ótima estabelecida era diluída em 10 ml de tampão de incubação (APÊNDICE 3), homogeneizada e distribuída com pipeta multicanal (100 µl por poço, exceto na primeira coluna da placa, utilizada para “zerar” o aparelho). Então, a placa era incubada a 37 °C por uma hora.

#### h) Quarta lavagem

Esta etapa tem por objetivo a remoção do conjugado que não se uniu aos anticorpos ligados ao antígeno. Como um mínimo resquício de peroxidase em um poço pode aumentar significativamente a DO da amostra, esta lavagem deve ser minuciosa. Desta forma, procedeu-se como na terceira lavagem.

---

<sup>8</sup> SIGMA A3415

#### i) Adição do Substrato

Esta etapa consiste em adicionar o substrato da enzima peroxidase. Foi utilizado o OPD (orto-fenileno-diamino, SIGMA P6787), uma substância cromógena, capaz de adquirir coloração amarelada sob ação da enzima peroxidase. Como catalizador, utilizou-se o peróxido de hidrogênio e, como veículo, o tampão citrato, pH 5,0 (APÊNDICE 3). A solução de substrato (2 mg de OPD; 10,5 ml de tampão citrato e 2 µl de peróxido de hidrogênio) foi preparada no momento de usar. Com a pipeta multicanal colocou-se 100 µl por poço, em toda a placa. A seguir, a placa foi incubada em temperatura ambiente, por 15 minutos, ao abrigo de luz.

#### j) Parada da reação

Para manter a uniformidade da reação em todos os poços da placa até o momento da leitura, é necessário interromper a ação da enzima sobre o substrato. Para isto, foi adicionado a cada poço 50 µl de uma solução de ácido sulfúrico a 5%. O ácido desnatura rapidamente a enzima peroxidase, promovendo a parada da reação.

#### l) Leitura

A leitura das densidades ópticas (DO) foi realizada em leitor de enzima-imunoensaio<sup>9</sup>, com filtro de 492 nm. O aparelho era ligado no mínimo 10 minutos antes da leitura para auto-calibração.

---

<sup>9</sup> BioRad - Model 550

#### 4.7.2 Enzima-imunoensaio indireto para detecção de anticorpos IgE anti-*Haemonchus contortus* (H.c.)

Foi utilizada a técnica descrita por SHAW *et al.* (1998, p.295), utilizada rotineiramente no *AgResearch Wallaceville, Upper Hutt*, Nova Zelândia.

##### 4.7.2.1 Preparo dos soros

Antes de serem diluídas para adição às placas, as amostras de soro foram tratadas com sulfato de amônio saturado (SAS) a fim de remover, por precipitação, as moléculas de IgG presentes. Para os soros dos cordeiros, trabalhou-se com uma concentração final de 36% SAS e, para os das ovelhas, com 39%.

Inicialmente, foi preparada uma solução de SAS em salina, no dobro da concentração final. Esta era adicionada no mesmo volume da amostra a ser submetida à precipitação. A mistura era homogeneizada imediatamente em *vortex* por 10 segundos. Este procedimento era repetido 15 minutos mais tarde. Após mais 15 minutos, as amostras eram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante era colhido e armazenado a 5 °C em novos tubos.

Para análise do soro dos cordeiros, cada amostra resultante da precipitação em SAS era diluída ½ em solução fisiológica com 0,1% Tween 20 (diluição final ¼). Para o soro das ovelhas, trabalhou-se com uma diluição final de 1/20.

##### 4.7.2.2 Execução da técnica

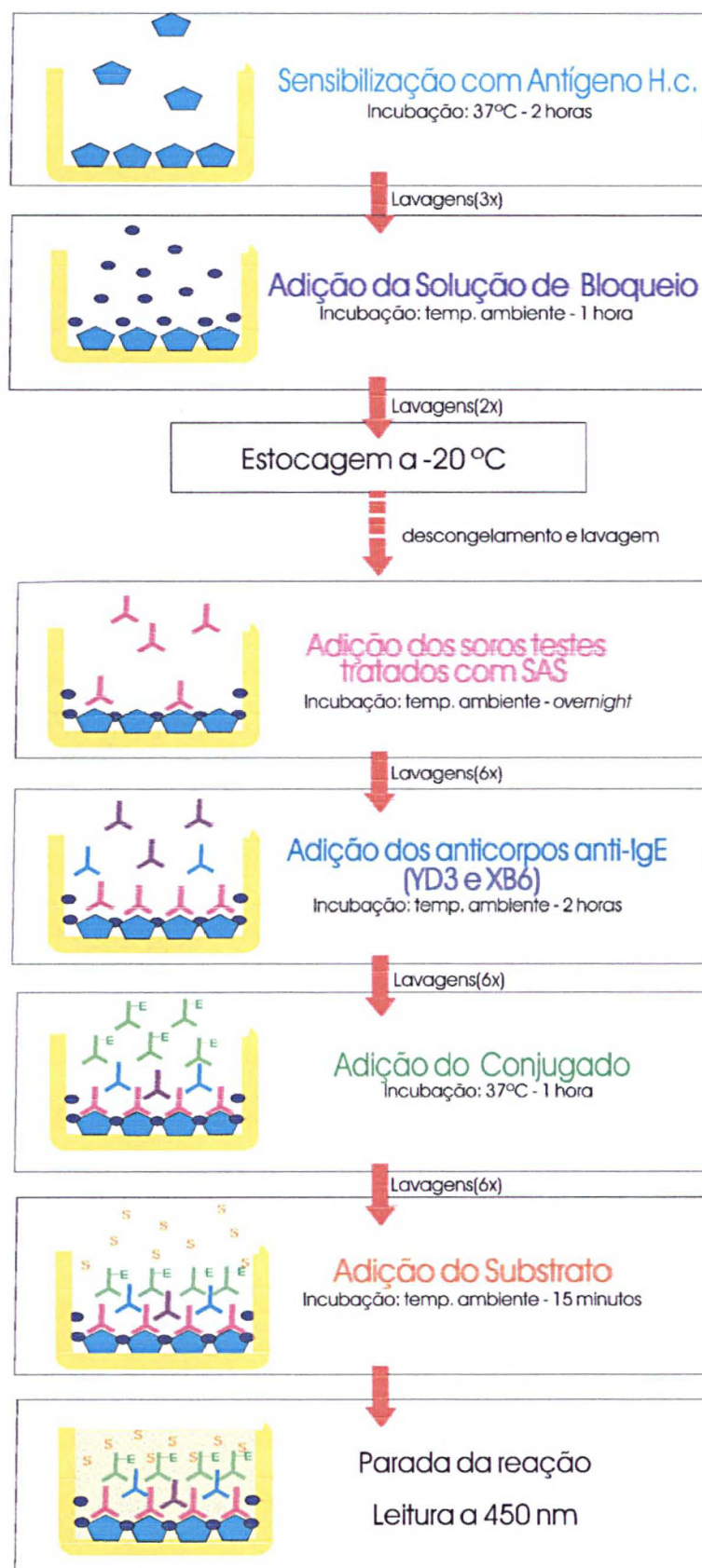
As placas<sup>10</sup> foram sensibilizadas com 500 ng de antígeno H.c. por poço. Após o bloqueio, as mesmas foram estocadas a – 20° C até o uso (FIGURA 4). Cem microlitros de cada amostra de soro precipitada e diluída eram acrescidos em duplicata

---

<sup>10</sup> NUNC 430341



FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE ENZIMA-IMUNOENSAIO INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgE ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* (H.c.) SEGUNDO SHAW *ET AL.* (1998, p.295)



à placa teste, e incubados *overnight* em temperatura ambiente. Após seis lavagens, os anticorpos monoclonais (mAbs) anti-IgE ovina YD3 e XB6, produzidos a partir de células de camundongos imunizados (SHAW *et al.*, 1996, p.235-251), eram adicionados na concentração de  $2,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  e incubados por duas horas em temperatura ambiente. A placa era lavada seis vezes antes da adição do conjugado peroxidase-anti-IgG (cadeia  $\gamma$ ) murina<sup>11</sup>, diluído 1/1000, na quantidade de 100  $\mu\text{l}$  por poço. A placa era incubada a 37 °C por uma hora. Mais seis lavagens foram realizadas para remoção do conjugado que não se ligou.

Quando o soro dos cordeiros foi analisado, o substrato utilizado para revelar a presença da peroxidase foi o tetra-metil-benzidino<sup>12</sup> (TMB), que foi deixado agir por 15 minutos. A parada da reação foi realizada pela adição de 50  $\mu\text{l}$  por poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A leitura era realizada com filtro de 450 nm. Para análise do soro das ovelhas a adição do substrato e a parada da reação foram procedidas como descrito nos itens 4.7.1.3.i e 4.7.1.3.j.

#### 4.7.3 Enzima-imunoensaio de captura para detecção de anticorpos IgE

Ao contrário dos métodos de enzima-imunoensaio indiretos descritos acima, que visam identificar algum nível de resposta para um determinado antígeno, este método mede os níveis séricos de totais de IgE. Neste estudo foi utilizado o método de SHAW *et al.* (1997, p.253-265), que expressa os valores de IgE total em unidades. $\text{ml}^{-1}$ . Cada unidade representa  $0,86 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de IgE purificada.

A técnica foi executada no *AgResearch Wallaceville, Upper Hutt*, Nova Zelândia. Apenas as amostras de soro dos cordeiros foram submetidas a esta técnica.

---

<sup>11</sup> SIGMA A3673

<sup>12</sup> SIGMA T8768

A primeira etapa desta técnica consiste em sensibilizar a placa de poliestireno<sup>13</sup> com os anticorpos de captura (FIGURA 5). Para isto, utilizou-se 50 µl por poço de uma solução de 2 µg.ml<sup>-1</sup> do mAb anti-IgE ovina YD3 (SHAW *et al.*, 1996, p.235-251) em PBS 7,4. A placa foi incubada por duas horas em temperatura ambiente. Para remoção dos mAbs que não se fixaram à placa foram realizadas seis lavagens. A seguir foi realizado o bloqueio da placa e incubação por uma hora em temperatura ambiente.

A próxima etapa era a adição do soro. Além das amostras para teste, eram adicionados a cada placa um soro padrão, de 100 unidades de IgE ml<sup>-1</sup>, em diluições seriais de 1/125; 1/250; 1/500; 1/1000 e 1/2000 a fim de se obter uma curva padrão. Todas as amostras foram diluídas inicialmente a 1/50 para triagem. Quando os valores de DO obtidos para esta diluição excediam os limites lineares da curva padrão, a amostra era re-testada em nova diluição, até que se enquadrasse nos limites da curva.

Cada amostra de soro (teste ou padrão) era adicionada na quantidade de 50 µl por poço e incubada em temperatura ambiente por duas horas, depois a 4 °C *overnight*. As proteínas que não se ligaram à placa eram removidas por seis lavagens.

A próxima etapa consistiu na adição do anticorpo de detecção. Para tanto, foi adicionado 50 µl de uma solução de 1,2 µg do mAb<sup>σ</sup> XB6 biotinilado (SHAW *et al.*, 1996, p.235-251) ml<sup>-1</sup>. A placa foi incubada em temperatura ambiente por duas horas e, a seguir, foi lavada seis vezes.

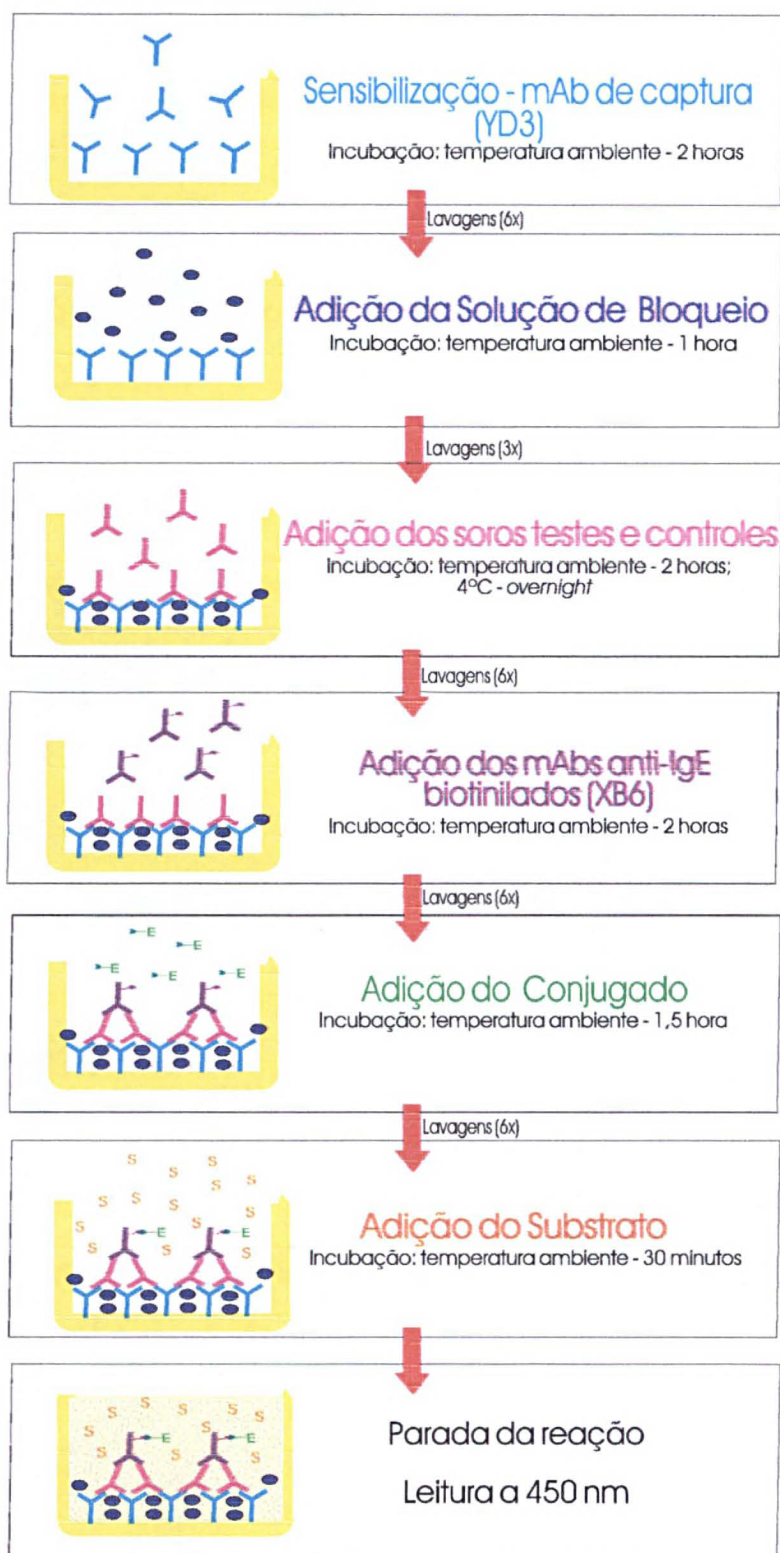
O conjugado utilizado foi streptavidina-peroxidase<sup>14</sup>. Após acrescentar a cada poço 50 µl do conjugado diluído 1/2000, a placa foi incubada em temperatura ambiente por uma hora e meia e lavada seis vezes. A adição do substrato e a parada da reação foi como descrito para a enzima-imunoensaio para IgE específica (item 4.7.2), exceto que foi deixado o substrato agir por 30 minutos antes da parada da reação.

---

<sup>13</sup> NUNC 430341

<sup>14</sup> PIERCE 21126

FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DO MÉTODO DE ENZIMA-IMUNOENSAIO DE CAPTURA PARA QUANTIFICAÇÃO DA IgE SÉRICA TOTAL, SEGUNDO SHAW *ET AL.* (1996, p.235-251)



Com base nos resultados de DO obtidos para cada diluição do padrão, foi obtida uma curva para cálculo da concentração de IgE total nas amostras-teste (ANEXO II). Se o soro padrão apresenta 100 unidades de IgE ml<sup>-1</sup>, as diluições de 1/125; 1/250; 1/500; 1/1000 e 1/2000 representam 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,05 unidades ml<sup>-1</sup>, respectivamente. A curva utilizada foi do tipo Log-Log, obtida por meio da tabulação do Log da DO contra o Log de unidades de IgE ml<sup>-1</sup> correspondentes à cada diluição. Esta é uma curva linear, ou seja, apresenta um formato  $y = a + bx$ , e é específica para controlar as variações inerentes a cada placa. A substituição de y pela média da DO das duplicatas da amostra-teste permitiu o cálculo do Log da quantidade de IgE na diluição utilizada (x). Para se ter acesso às unidades de IgE ml<sup>-1</sup> de soro elevou-se 10 à potência do x obtido e multiplicou-se pela diluição utilizada. Por exemplo, se o valor obtido para x fosse (-0,1627), e a diluição do soro utilizada fosse 1/25, o valor de unidades de IgE ml<sup>-1</sup> para a amostra seria:

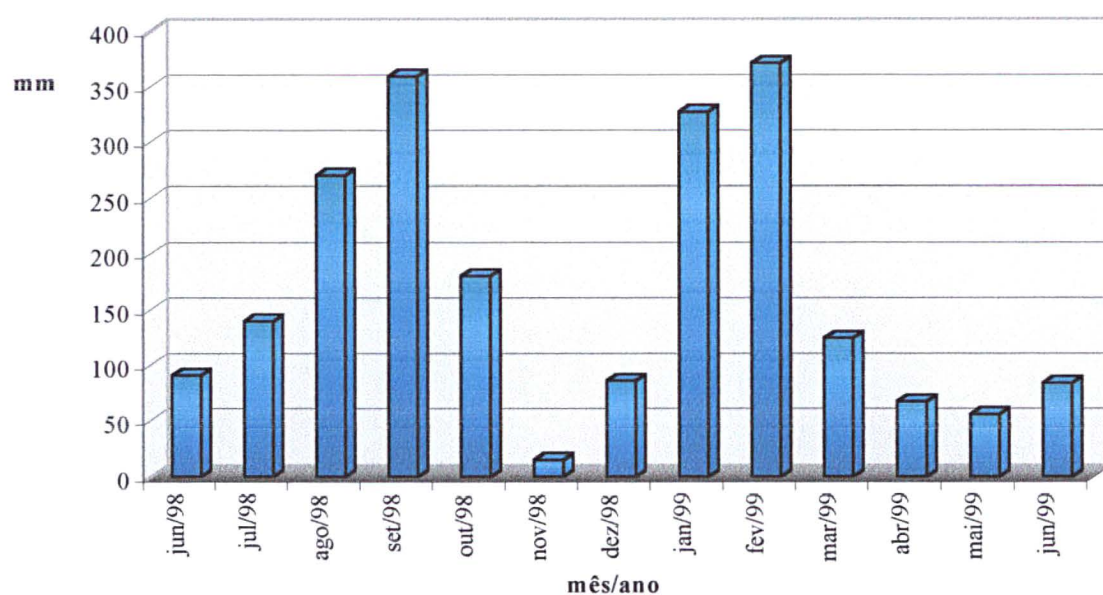
$$10^{-0,1627} \times 25 = 17,19 \text{ unidades ml}^{-1}$$

#### 4.8 CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS

O período de junho de 1998 a junho de 1999 foi considerado atípico para a Região Metropolitana de Curitiba, devido aos altos índices pluviométricos (GRÁFICO 1). O mês mais chuvoso foi o de fevereiro, com 371 mm. A menor precipitação foi registrada no mês de novembro, com apenas 14,8 mm.

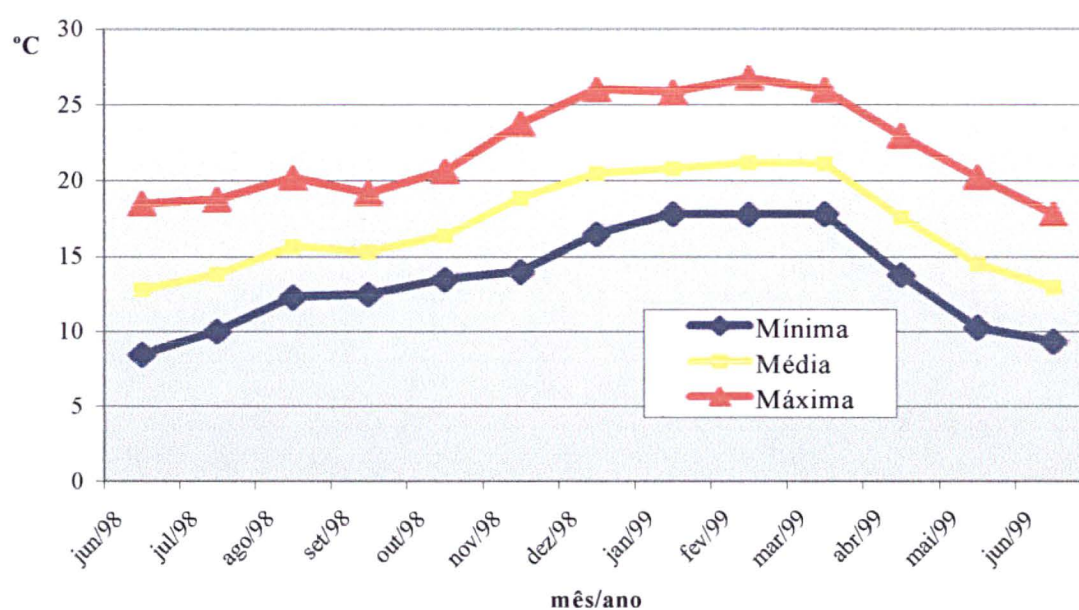
A temperatura média foi baixa no mês de junho, apresentou pequena ascensão de agosto a novembro, e se manteve elevada de dezembro a maio (GRÁFICO 2). No outono, foi observada nova queda gradual na temperatura. O mês de junho foi o mais frio, com temperaturas médias de 12,79 e 12,93 °C; e média das temperaturas mínimas de 8,46 e 9,36 °C, para os anos de 1998 e 1999, respectivamente. O mês mais quente foi o de fevereiro de 1999, com temperatura média de 21,15 °C e média das temperaturas máximas de 26,75°C.

GRÁFICO 1 – TOTAL MENSAL DE CHUVAS (mm) NA CIDADE DE CURITIBA, NO PERÍODO DE JUNHO DE 1998 A JUNHO DE 1999.



FONTE: SIMEPAR.

GRÁFICO 2 – MÉDIAS DAS TEMPERATURAS MÁXIMAS, MÉDIAS E MÍNIMAS POR MÊS NA CIDADE DE CURITIBA, NO PERÍODO DE JUNHO DE 1998 A JUNHO DE 1999.



FONTE: SIMEPAR.



#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, todos os dados foram armazenados em planilhas eletrônicas do *Microsoft Excel 97*. Os gráficos descritivos das variáveis também foram confeccionados neste *software*. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa *Statistica*, versão 5.0, exceto a análise de variância para o cálculo da Repetibilidade, realizado no *MSTAT-C*, versão 2.10.

A fim de se diminuir o coeficiente de variação das variáveis estudadas, foi empregada a transformação logarítmica dos dados. Para isto, os dados de opg foram transformados no logaritmo decimal do valor mais uma unidade ( $\log(\text{opg}+1)$ ); os de eosinófilos, IgE total, IgE e IgG específicas, no logaritmo decimal do valor ( $\log(\text{EOSINO})$ ;  $\log(\text{t IgE})$ ;  $\log(\text{IgE})$ ;  $\log(\text{IgG})$ ).

Para o estudo do comportamento de cada variável no rebanho, os dados foram submetidos à Análise de Variância e as médias de cada coleta foram comparadas pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$ . Este teste de médias foi escolhido por ser ideal para variáveis com coeficiente de variação elevado (SAMPAIO, 1998, p.188).

Para as análises de correlações entre os marcadores estudados, optou-se pelo teste não paramétrico de Spearman, aplicado sobre os dados não transformados. Foram consideradas significativas as correlações cujo  $p$  foi menor que 0,10. Os marcadores também foram correlacionados com a idade, o peso ao nascimento e ao desmame dos cordeiros. A idade foi medida em dias e contada na data do desmame (06 de outubro).

A repetibilidade foi estimada para cada marcador estudado, conforme descrito por GIANONNI e GIANONNI (1989, p.122-126).

Para a seleção dos animais, diferentes combinações entre as variáveis foram submetidas à análise de *cluster*. Este é um método capaz de agrupar unidades (animais) com base nos valores de várias medidas simultaneamente (marcadores). Os resultados são expressos em um diagrama em árvore ou dendrograma, com uma escala para que se possa observar os níveis de agrupamento. A escala adotada foi a distância

euclidiana, que corresponde à distância geométrica entre as unidades no espaço multidimensional. Os *clusters* formados foram ligados com bases nos vizinhos distantes (*Complete linkage*), no qual a distância entre dois *clusters* é determinada pelos objetos mais extremos de cada um. Como as variáveis utilizadas para o agrupamento apresentavam diferentes unidades, os dados brutos (sem transformação logarítmica) foram “estandarizados” antes de submetidos à análise.

Uma vez obtidos os grupos resistente e susceptível pela análise de *cluster*, as médias de cada grupo para as variáveis analisadas ( $\log(\text{opg}+1)$ ;  $\log(\text{EOSINO})$ ;  $\log(\text{t IgE})$ ;  $\log(\text{IgE})$  e  $\log(\text{IgG})$ ) foram comparadas pelo teste t de Student.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais foram acompanhados durante um ano a fim de conhecer a carga parasitária e os picos de parasitismo. Estes fatores eram importantes para que se entendesse o padrão de resposta imune dos ovinos jovens e adultos aos parasitos, em um determinado período. Um indicador de parasitismo (número de ovos de helmintos por grama de fezes, opg) e os quatro indicadores de imunidade (eosinófilos, concentração de IgE total sérica e valores séricos de DO para anticorpos IgG e IgE anti-*Haemonchus contortus*) também foram utilizados como marcadores para identificação de animais resistentes e susceptíveis aos nematódeos gastrintestinais.

A resistência à parasitose mede a capacidade de um indivíduo albergar uma menor quantidade de helmintos em seu trato gastrintestinal (ALBERS *et al.*, 1987, p. 1355). Logo, o marcador parasitológico foi considerado um caracter de seleção direta, pois ele determina os ovinos de menor eliminação de ovos de helmintos (*low FEC*). Como a expressão da resistência pode ser reflexo de uma resposta imune adquirida (GILL, 1991, p.625), todos os marcadores imunológicos foram considerados caracteres de seleção indireta, porque eles determinam os animais de maior resposta imune contra os parasitos ("*high responders*").

As técnicas de laboratório para a determinação dos marcadores imunológicos foram utilizadas neste experimento conforme descritas na literatura. A única exceção foi a técnica de enzima-imunoensaio para determinação de anticorpos IgG anti-H.c., que teve de ser padronizada para a execução do trabalho. A fim de facilitar a compreensão dos leitores, os resultados de padronização desta técnica serão os primeiros a serem apresentados e discutidos.

A seguir, serão apresentados e discutidos os resultados do acompanhamento parasitológico e imunológico dos animais, a análise de correlação entre os marcadores, os valores de repetibilidade de cada marcador, as hipóteses de seleção direta pelo

marcador parasitológico, as hipóteses de seleção por mais de um marcador e as hipóteses de seleção indireta pelos caracteres imunológicos. Primeiro serão apresentados os resultados obtidos para as ovelhas e depois os obtidos para os cordeiros.

## 5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ENZIMA-IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE IgG ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS*

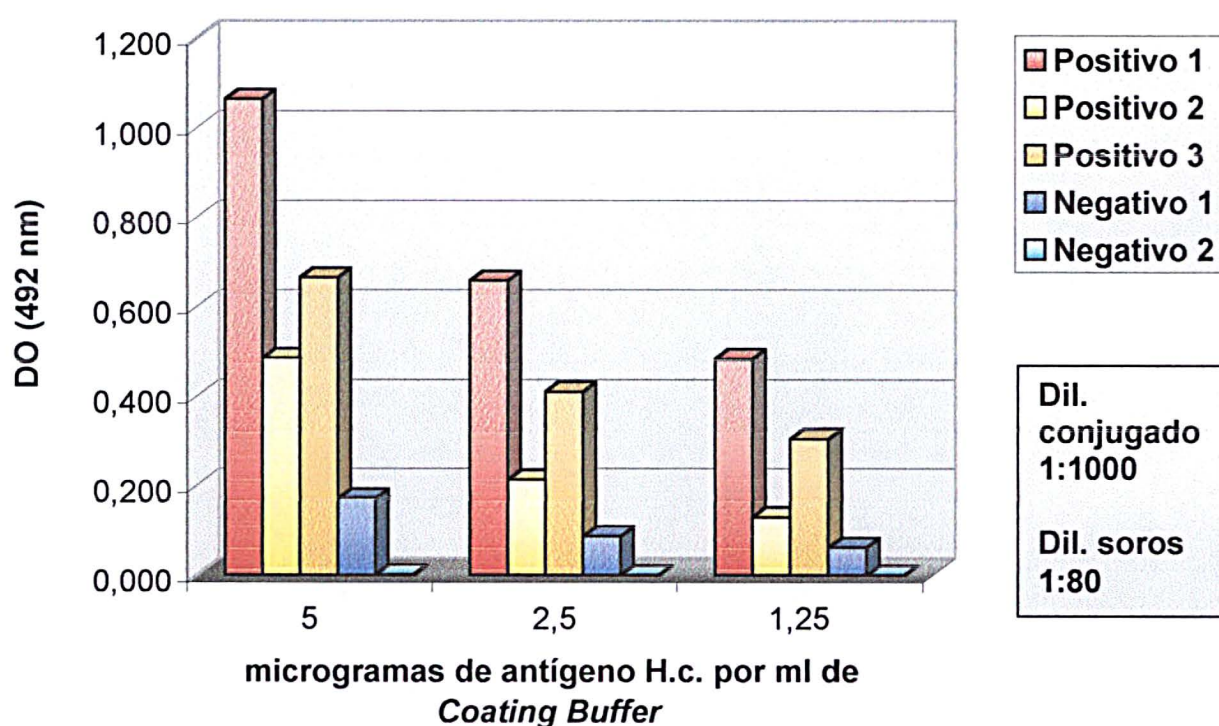
### 5.1.1 Quantidade de antígeno para sensibilização da placa

A concentração protéica do antígeno H.c. foi estimada em  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  pelo método de BRADFORD (1976, p.248-254) (ANEXO 1). Para a padronização da quantidade de antígeno por orifício da placa, a solução antigênica original foi diluída a 5 ; 2,5 e  $1,25 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  em *Coating Buffer*. Cada uma destas três concentrações foi incubada com duas diluições de soros controles positivos e negativos (1:40 e 1:80) e duas diluições do conjugado anti-IgG ovina (1:1000 e 1:2500). Estes parâmetros foram testados anteriormente e demonstraram os melhores valores de densidades ópticas em outras cinco placas-teste. A fim de descartar um possível erro na escolha dos padrões ocasionado pela variação entre placas, a validação dos mesmos só poderia ocorrer após um teste realizado sob as mesmas condições, em uma mesma placa.

A determinação da quantidade ótima de antígeno por orifício foi realizada ao confrontar os valores de densidade óptica obtidos para as três concentrações antigênicas analisadas, mantendo constante a diluição dos soros e conjugado. Quando os soros controles foram diluídos 1:80 e o conjugado 1:1000 vezes, pôde-se observar melhor distinção entre os soros positivos e negativos na concentração de  $5 \mu\text{g}$  de antígeno por ml de *Coating Buffer* (GRÁFICO 3). Como as placas foram sensibilizadas

com 100 µl da solução antigênica por orifício, a concentração ótima padronizada (5µg ml<sup>-1</sup>) corresponde à quantidade de 500 ng de antígeno por orifício.

GRÁFICO 3 - VALORES DE DENSIDADE ÓPTICA (DO) DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA *HAEMONCHUS CONTORTUS* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO SOMÁTICO DO PARASITO ADULTO POR ORIFÍCIO, QUANDO OS SOROS FORAM DILUÍDOS 1:80 E O CONJUGADO ANTI-IgG OVINA 1:1000 VEZES



NOTA: Soros controles positivos 1 e 2 obtidos de ovelhas adultas, na coleta de 02 de Março de 1999, anterior ao pico de eliminação de opg (GRÁFICO 6); soro controle positivo 3 corresponde a um *pool* de soros das ovelhas adultas; soro controle negativo 1 proveniente de cordeiro tratado e mantido em condições livres de parasitismo por dois meses; soro controle negativo 2 corresponde a uma amostra de soro pré-colostral.

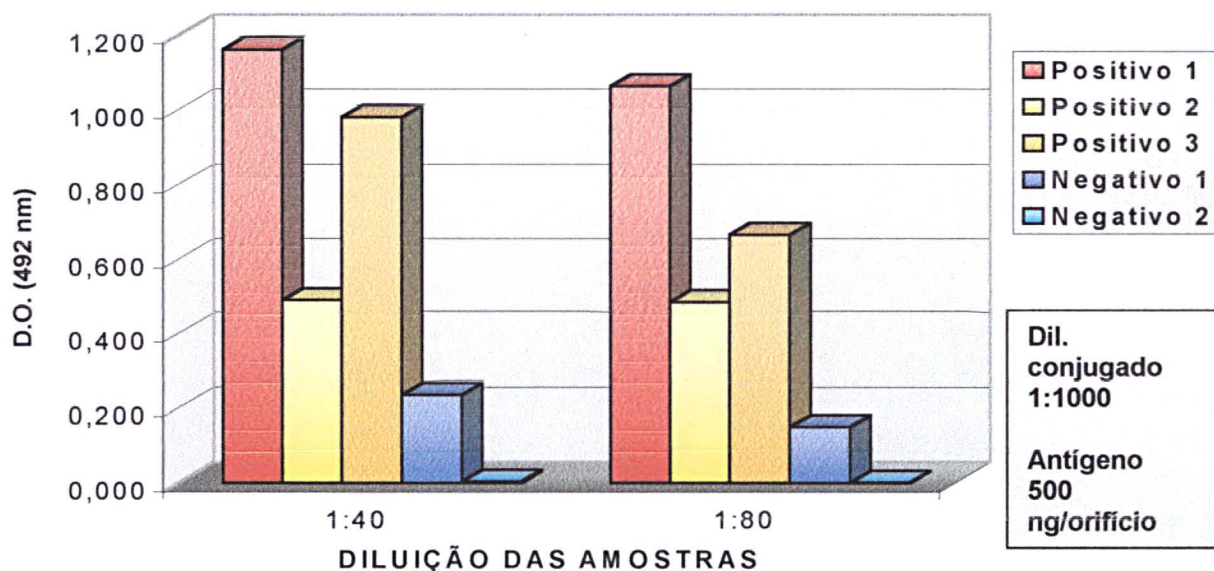
A concentração de 5  $\mu\text{g}$  de antígeno somático de *Haemonchus contortus* adultos por ml de tampão carbonato também foi utilizada por GILL (1991, p. 619); SCHALLIG *et al.* (1995, p.333) e GÓMEZ-MUÑOZ *et al.* (1998, p.450). CUQUERELLA *et al.* (1994, p.245) utilizaram a concentração de 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de antígeno somático de  $L_3$  de *H. contortus*. Porém, quando o antígeno foi obtido a partir de parasitos adultos, a concentração empregada foi a de 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Portanto, a concentração de antígeno utilizada neste trabalho está coerente com a utilizada por outros autores.

#### 5.1.2 Padronização da diluição do soro

Para a padronização da diluição ótima de soro a ser empregada, duas diluições foram comparadas (1:40 e 1:80). O antígeno foi utilizado na quantidade de 500 ng por orifício e o conjugado, diluído 1:1000. A diluição de 1:40 resultou valores de DO relativamente altos, especialmente para o controle negativo 1, cuja DO foi de 0,236 (GRÁFICO 4). Quando a diluição utilizada foi de 1:80, os valores de DO para os controles positivos foram entre 1,063 e 0,485, e o valor do controle negativo 1 foi de 0,151.

O grau de reações inespecíficas ocasionado pelas diferentes diluições de soro também foi analisado na placa de padronização. Para isto, os orifícios não foram sensibilizados com antígeno H.c. e foram bloqueados conforme descrito no item 4.7.1.3.b. As amostras de soro diluídas 1:40 apresentaram valores muito altos de DO, sobretudo para os controles positivos (TABELA 2). Ao aumentar a diluição para 1:80, os valores de DO para reações inespecíficas caíram para níveis menores que 0,050. Portanto, a maior diluição do soro proporcionou melhor distinção entre os controles positivos e negativos, bem como a diminuição da ocorrência de respostas inespecíficas. Por isto optou-se pelo uso da diluição 1:80.

GRÁFICO 4 - VALORES DE DENSIDADE ÓPTICA (DO) DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA *HAEMONCHUS CONTORTUS* EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DOS SOROS CONTROLES, QUANDO A PLACA FOI SENSIBILIZADA COM 500 ng DE ANTÍGENO H.c. POR ORIFÍCIO E O CONJUGADO ANTI-IgG OVINA FOI DILUÍDO 1:1000 VEZES



NOTA: Soros controles positivos 1 e 2 obtidos de ovelhas adultas, na coleta de 02 de Março de 1999, anterior ao pico de eliminação de opg (GRÁFICO 6); soro controle positivo 3 corresponde a um *pool* de soros das ovelhas adultas; soro controle negativo 1 proveniente de cordeiro tratado e mantido em condições livres de parasitismo por dois meses; soro controle negativo 2 corresponde a uma amostra de soro pré-colostral.

A diluição do soro é o fator que mais varia na padronização de testes imunoenzimáticos. Para detecção de IgG anti-*Haemonchus contortus*, foram encontradas diluições de 1:100 (CUQUERELLA *et al.*, 1994, p.245) a 1:1000 (GÓMEZ-MUÑOZ *et al.*, 1998, p.450). A diluição ótima dos soros depende de outras condições padronizadas no teste, como a concentração de outros reativos empregados e do tempo de incubação em cada fase do enzima-imunoensaio. Estes fatores variam conforme a rotina de cada laboratório, tornando difícil a utilização de uma mesma diluição de soro para todos os ensaios. Outro fator que pode influenciar na diluição de soro escolhida é a concentração de anticorpos presentes na população teste. Desta forma, um conjunto de amostras que apresentem altos títulos de anticorpos específicos tendem a ser analisadas sob maior fator de diluição. Neste trabalho, as amostras teste eram todas



provenientes de ovinos com infecção natural. É possível que estes animais tenham apresentado menores títulos de anticorpos que animais submetidos a infecções experimentais com alto nível de desafio. Isto explicaria o menor fator de diluição de soros empregado neste trabalho se comparado com o de outros autores.

TABELA 2 – VALORES DE DENSIDADE ÓPTICA (DO) INESPECÍFICOS E ESPECÍFICOS PARA IgG ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* (H.c.) QUANDO DUAS DILUIÇÕES DE SORO SÃO ANALISADAS

DILUIÇÃO DO SORO	AMOSTRA DE SORO	DO PARA IgG ANTI-H.c.	DO PARA REAÇÃO INESPECÍFICA <sup>(1)</sup>	DO CORRIGIDA <sup>(2)</sup>
1:40	Controle positivo 1	1,162	0,104	1,058
	Controle positivo 2	0,491	0,082	0,409
	Controle positivo 3	0,980	0,078	0,902
	Controle negativo 1	0,236	0,047	0,189
	Controle negativo 2	0,004	0,000	0,004
1:80	Controle positivo 1	1,063	0,049	1,014
	Controle positivo 2	0,485	0,049	0,436
	Controle positivo 3	0,666	0,046	0,620
	Controle negativo 1	0,151	0,027	0,124
	Controle negativo 2	0,001	0,000	0,001

NOTA: Soros controles positivos 1 e 2 obtidos de ovelhas adultas, na coleta de 02 de Março de 1999, anterior ao pico de eliminação de opg; soro controle positivo 3 corresponde a um *pool* de soros das ovelhas adultas; soro controle negativo 1 proveniente de cordeiro tratado e mantido em condições livres de parasitismo por dois meses; soro controle negativo 2 corresponde a uma amostra de soro pré-colostral.

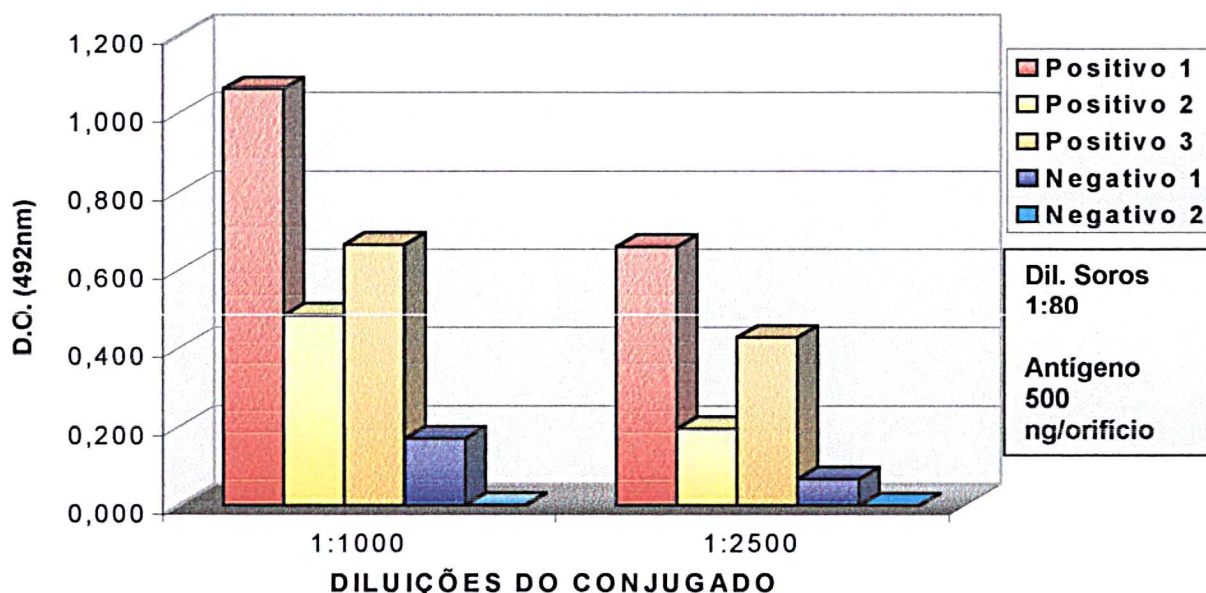
(1) Resulta do reconhecimento de anticorpos inespecíficos presentes no soro; obtida quando a placa não é sensibilizada com antígeno somático de *Haemonchus contortus*

(2) Obtida pela diferença entre DO específica para IgG anti-H.c. e DO inespecífica. Representa a real reatividade do soro ao antígeno específico.

### 5.1.3 Padronização da diluição do conjugado

A princípio, o conjugado anti-IgG ovina foi diluído serialmente de 1:1000 a 1:10000 vezes. Somente foram obtidos valores significativos de absorbância nas diluições de 1:1000 e 1:2500 vezes. Por este motivo, estas diluições foram analisadas na placa de padronização do teste de ENZIMA-IMUNOENSAIO para detecção de IgG anti-*H. contortus*. Ao manter fixa a quantidade de antígeno em 500 ng por orifício e a diluição do soro em 1:80, pôde-se observar uma drástica redução nos valores de densidade óptica na diluição de 1:2500 (GRÁFICO 5). Por isso, a diluição de 1:1000 foi escolhida para a continuidade do trabalho.

GRÁFICO 5 - VALORES DE DENSIDADE ÓPTICA (DO) DOS SOROS DE OVINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA *HAEMONCHUS CONTORTUS* EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DO CONJUGADO ANTI-IgG OVINA, QUANDO A PLACA FOI SENSIBILIZADA COM 500 ng DE ANTÍGENO H.c. POR ORIFÍCIO E OS SOROS CONTROLES FORAM DILUÍDOS 1:80 VEZES



NOTA: Soros controles positivos 1 e 2 obtidos de ovelhas adultas, na coleta de 02 de Março de 1999, anterior ao pico de eliminação de opg (GRÁFICO 6); soro controle positivo 3 corresponde a um *pool* de soros das ovelhas adultas; soro controle negativo 1 proveniente de cordeiro tratado e mantido em condições livres de parasitismo por dois meses; soro controle negativo 2 corresponde a uma amostra de soro pré-colostral.

Como o conjugado é o reativo de maior custo em uma prova de imunoensaio, tenta-se utilizar a maior diluição possível do mesmo, desde que isto não diminua a DO dos soros controle ao ponto de prejudicar a distinção entre controles positivos e negativos. Neste estudo foi utilizado um conjugado comercial, cuja recomendação do fabricante é a titulação do mesmo por meio de diluições sucessivas até 1:10000. A diluição de 1:1000 foi a que mostrou valores mais satisfatórios de DO para os soros controles.

Embora a diluição ótima de conjugado dependa de suas características intrínsecas e das condições do ensaio, é comum o uso de conjugados comerciais na diluição de 1:1000 (GILL, 1991, p. 619; CUQUERELLA *et al.*, 1994, p. 245; SCHALLIG *et al.*, 1995, p.333; GÓMEZ-MUÑOZ *et al.*, 1998, p.450).

#### 5.1.4 Precisão da técnica de imunoensaio padronizada

Uma vez padronizadas a concentração do antígeno, a diluição dos soros-teste e do conjugado anti-IgG ovina, várias placas foram analisadas. Cada uma continha de trinta a quarenta amostras de soros-teste em duplicata, além de controles negativos e positivos. Foi obtido um coeficiente de variação de 3,901% entre as duplicatas de amostras, que foi considerado a variação média intra-placas. A variação entre placas foi considerada o coeficiente de variação dos soros controles, que foi de 10,959%. SHAW *et al.* (1997, p.258) obtiveram índices de até 4,6% e 9,7% de variação intra e entre placas, respectivamente, para um imunoensaio de captura para detecção de IgE sérica total. Portanto, a variabilidade obtida para o ensaio padronizado neste trabalho foi coerente com o descrito na literatura.



## 5.2 CONTROLE PARASITÁRIO DOS ANIMAIS

Visando uma menor contaminação de pastagem e um máximo estímulo ao sistema imune dos animais, foi necessária desverminação nas seguintes datas:

- ✓ dia 21/07: desverminação das ovelhas com 7,5 mg de cloridrato de levamizol<sup>15</sup> kg<sup>-1</sup>, o que resultou num percentual de redução de opg (R) de 88,60%;
- ✓ dia 02/09: desverminação de ovelhas e cordeiros com 20 µg de moxidectin<sup>16</sup> kg<sup>-1</sup> (R de 98,91 e 92,0 %, respectivamente);
- ✓ dia 08/12: desverminação dos cordeiros com 10 mg de Closantel<sup>17</sup> e 5 mg de oxfendazole<sup>18</sup> kg<sup>-1</sup> (R de 71,65 %);
- ✓ dia 09/02: desverminação dos cordeiros com 20 µg de moxidectin<sup>16</sup> kg<sup>-1</sup> (R de 94,0 %);
- ✓ dia 06/04: desverminação das ovelhas com 20 µg de moxidectin<sup>16</sup> kg<sup>-1</sup> (R de 99,26 %);
- ✓ dia 11/05: desverminação dos cordeiros com 10 mg de Closantel<sup>17</sup> e 7,5 mg de cloridrato de levamizol<sup>15</sup> kg<sup>-1</sup> (R de 93,24 %).

Desconsiderando-se o tratamento utilizado para o “zerar” a contagem de opg dos animais no início do acompanhamento individual, foram necessários quatro desverminações no lote de cordeiros e três no de ovelhas, durante os 12 meses de acompanhamento. Isto mostra que o atual sistema de controle da parasitose gastrintestinal empregado nas propriedades paranaenses, com dosificações múltiplas e supressivas, é desnecessário e oneroso.

---

<sup>15</sup> Ripercol L ® Cyanamid Química do Brasil Ltda.

<sup>16</sup> Cydectin ® Cyanamid Química do Brasil Ltda.

<sup>17</sup> Closantel ® Fatec. S.A.

<sup>18</sup> Systamex Suspensão ® Mallinckrodt Veterinária.

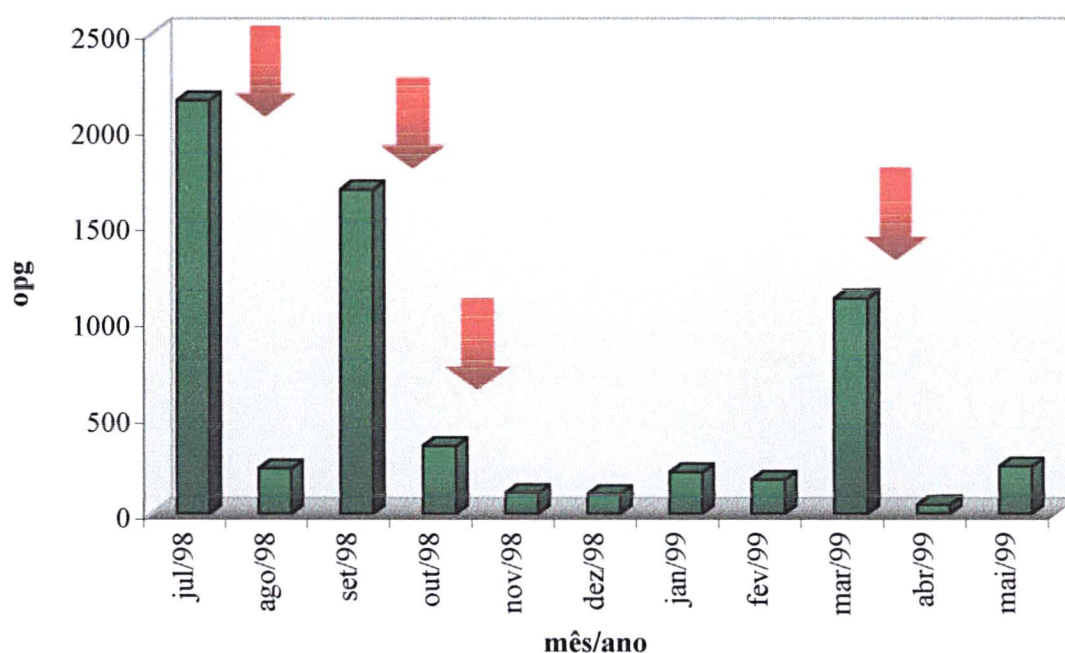
### 5.3 ACOMPANHAMENTO PARASITOLÓGICO DAS OVELHAS

Os exames coproparasitológicos revelaram a presença de ovos de helmintos da superfamília Strongyloidea (ovos strongiliformes e de *Nematodirus* sp.); dos gêneros *Strongyloides* sp., *Moniezia* sp. e oocistos de *Eimeria* spp. A média total de opg (GRÁFICO 6) mostra três picos de eliminação durante o período acompanhado. O primeiro, em julho, e o segundo, em setembro, ocorreram durante o período de lactação e podem ser atribuídos ao "fenômeno peri-puerperal". Após o desmame e o tratamento efetuado para o acompanhamento individual, a média de opg se manteve baixa, com lenta ascensão até o mês de março (ANEXO III). Neste mês foi registrado o terceiro pico de verminose, com média de  $2028,57 \pm 3511,97$  opg. Este pico pode ser explicado pela alta contaminação da pastagem pelos animais jovens e pelas condições meteorológicas favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência das larvas infectantes. A ocorrência dos picos de parasitismo em animais adultos, presenciada neste trabalho, foi semelhante à obtida por MORAES *et al.* (1998, p.427) para a região de Ponta Grossa, Paraná.

A análise do opg por tipo de ovo de nematódeo (GRÁFICO 7) mostrou que os ovos de strongilídeos foram predominantes durante todo o período. Isto é explicável pela maior frequência e patogenicidade dos parasitos desta superfamília em ovinos (SANTIAGO, BEVENGA e COSTA, 1976, p.1-7; NARI e CARDOZO, 1987, p.12).

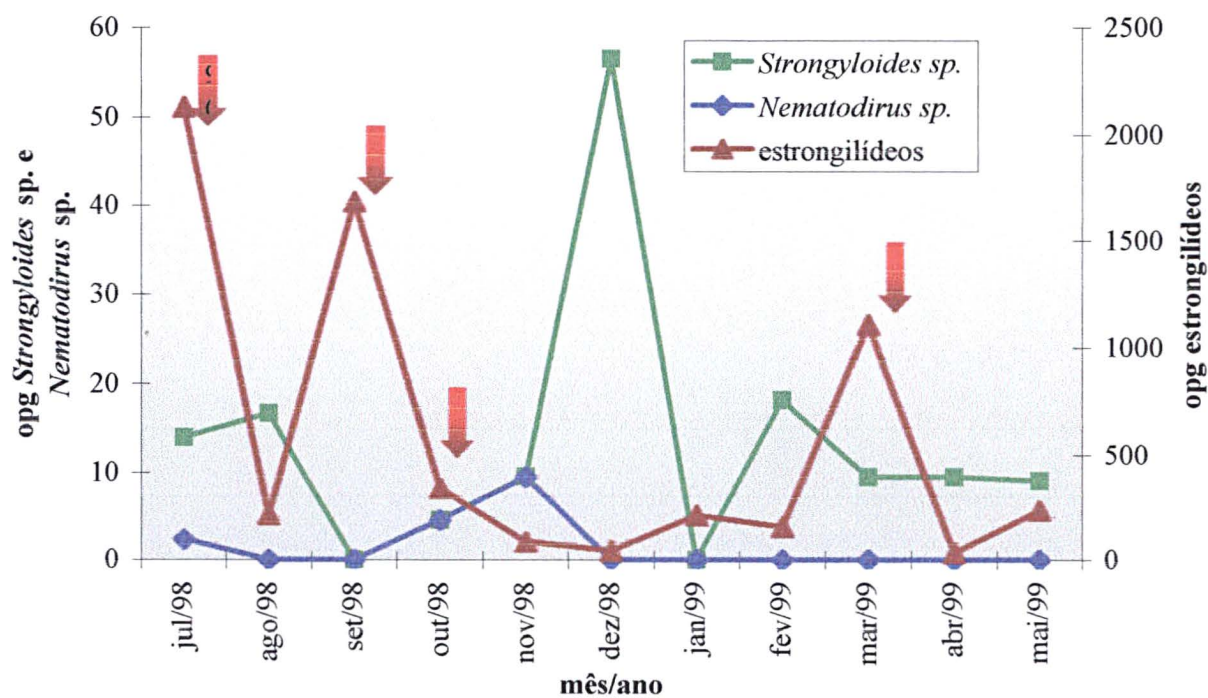
Ovos de *Nematodirus* sp. foram observados apenas nas coletas de julho, outubro e novembro. Em cada uma destas coletas, uma ovelha diferente foi assinalada como positiva para ovos do parasito. É bem possível que este parasito tenha estado presente durante todo o acompanhamento, mas sua baixa prevalência associada ao seu baixo potencial biótico (UENO e GONÇALVES, 1994, p.54) tenha dificultado a detecção dos ovos nos exames coproparasitológicos.

GRÁFICO 6 – MÉDIA MENSAL DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS ADULTAS, NO PERÍODO DE JULHO DE 1998 A MAIO DE 1999.



NOTA: As setas indicam as dosificações anti-helmínticas.

GRÁFICO 7 – MÉDIA MENSAL DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS ADULTAS, POR TIPO DE OVO ENCONTRADO, NO PERÍODO DE JULHO DE 1998 A MAIO DE 1999.



NOTA: As setas indicam as dosificações anti-helmínticas.

Os ovos de *Strongyloides papillosus* foram assinalados durante todo o acompanhamento, com dois ou três animais assinalados positivos na maioria das coletas. O único pico expressivo de eliminação de ovos deste parasito foi no mês de dezembro, com média de  $56,52 \pm 77,09$  opg no lote e nove animais positivos nos exames coproparasitológicos.

Apenas um baixo percentual dos animais se manteve positivo para ovos de *Moniezia* sp. e oocistos de *Eimeria* spp. (TABELA 3). Para ambos os parasitos, maior número de animais foi detectado positivo no período de lactação, mas a eliminação de ovos e oocistos por indivíduo se manteve residual. Estes achados estão de acordo com os de SOTOMAIOR (1997, p. 31); MORAES *et al.* (1998, p.427) e OLIVEIRA *et al.* (1999, p.494), que relatam a baixa prevalência destes parasitos em ovinos adultos.

TABELA 3 – PERCENTAGEM DE OVELHAS POSITIVAS PARA OVOS DE *MONIEZIA* SP. E OOCISTOS DE *EIMERIA* SPP. NO MÉTODO DE WILLIS (1927, p. 375-376), POR DATA DE COLETA

DATA	ANIMAIS POSITIVOS PARA <i>MONIEZIA</i> SP.		ANIMAIS POSITIVOS PARA <i>EIMERIA</i> SPP.	
	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
06/07/98	8	40,0	8	40,0
05/08/98 <sup>(1)</sup>	1	16,6	3	50,0
02/09/98 <sup>(1)</sup>	0	0,0	8	66,6
06/10/98	2	10,0	1	5,0
10/11/98	1	5,0	0	0,0
08/12/98	2	10,0	2	10,0
05/01/99	0	0,0	1	5,0
02/02/99	0	0,0	5	25,0
02/03/99	5	5,0	5	25,0
30/03/99	0	0,0	6	30,0
27/04/99	0	0,0	2	10,0
25/05/99	0	0,0	1	5,0
<b>MÉDIA</b>	<b>1,6</b>	<b>5,6</b>	<b>3,5</b>	<b>21,0</b>

NOTA: n = 20 animais acompanhados

(1) coleta por amostragem do lote

As coproculturas indicaram predominância dos gêneros *Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus* sp., com 61,9% e 20,2% do total de larvas recuperadas (GRÁFICO

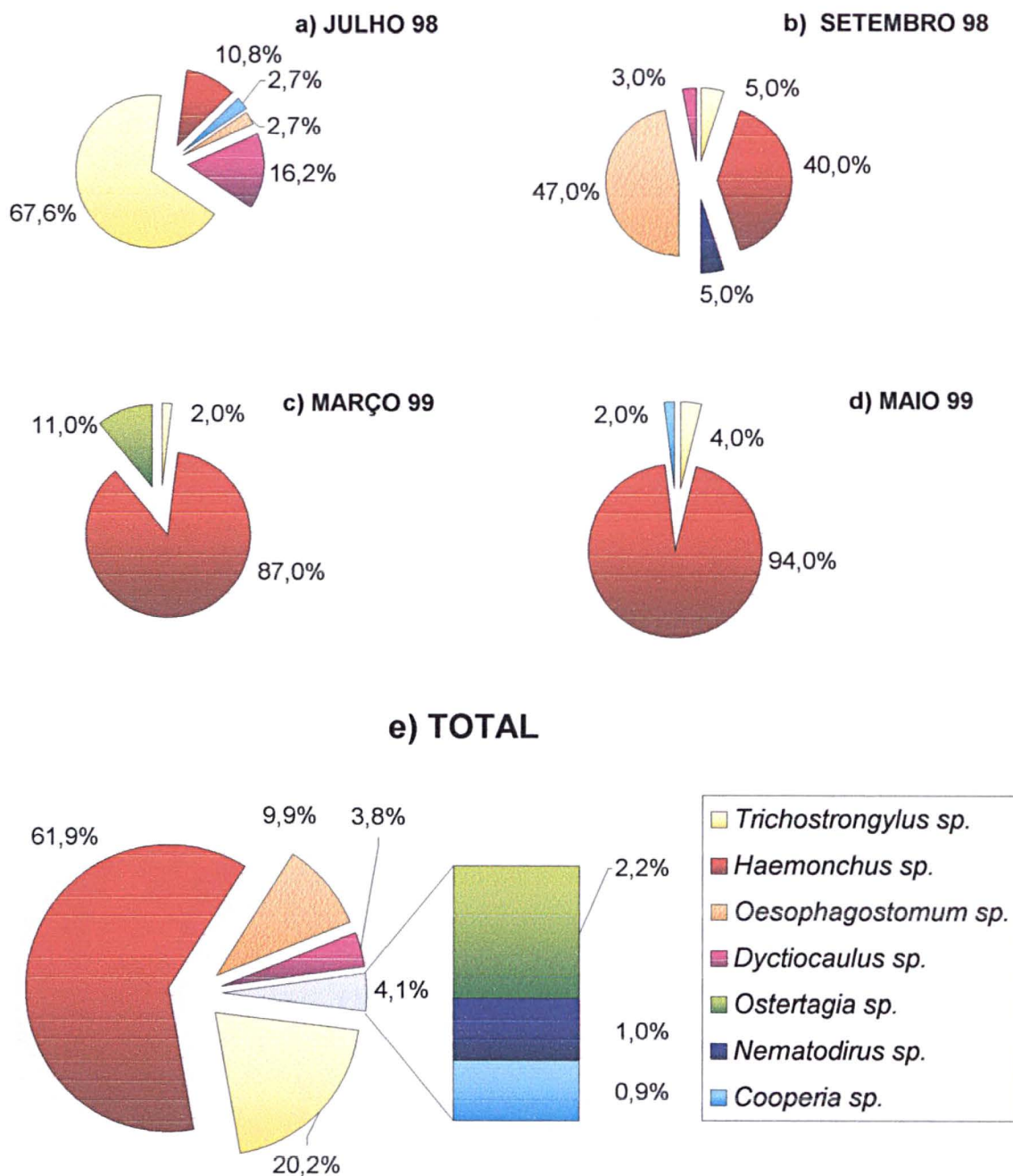
8.e). A maior importância epidemiológica destes dois parasitos também foi relatada por SANTIAGO, BEVENGA e COSTA (1976, p.1-7); NARI e CARDOZO (1987, p.12); ECHEVARRIA (1996b, p. 162), MORAES *et al.* (1998, p.427) e OLIVEIRA *et al.* (1999, p.494).

No pico de parasitismo de setembro, houve um aumento considerável na porcentagem de larvas de *Haemonchus* recuperadas na coprocultura (GRÁFICO 8.b). Este aumento pode estar associado às melhores condições de desenvolvimento de larvas infectantes no meio externo, que se torna menos adverso com a proximidade da primavera (fenômeno conhecido como “*Spring rise*”), bem como à desinibição das larvas hipobióticas. Segundo NARI e CARDOZO (1987, p.19), estes dois fatores podem contribuir para aumentar a carga parasitária da ovelha lactante.

O percentual de larvas de *Haemonchus* recuperadas em março e maio foi extremamente alto, com valores de 87,0 e 94,0% (GRÁFICO 8.c e 8.d). Isto era esperado, uma vez que é durante o outono que os estádios exógenos deste parasito encontram as condições mais adequadas para sua sobrevivência e desenvolvimento (ECHEVARRIA, 1996b, p. 158).

Durante o acompanhamento, também foram assinaladas larvas de *Dictyocaulus filaria*, *Ostertagia* sp., *Nematodirus* sp. e *Cooperia* sp. A alta prevalência de *Ostertagia* no mês de março é coerente com os achados de OLIVEIRA *et al.* (1999, p.494). O percentual de larvas de *Dictyocaulus filaria* encontrado no mês de julho (16,2 %) e de *Oesophagostomum* sp., no mês de setembro (47,0 %), são indicativos de importância clínica e epidemiológica. Entretanto, estes parasitos são considerados pouco patogênicos (ECHEVARRIA, 1996b, p. 162-163). As percentagens de recuperação de larvas de *Nematodirus* sp. e *Cooperia* sp. são coniventes com os dados de SANTIAGO, BEVENGA e COSTA (1976, p.1-7); NARI e CARDOZO (1987, p.12); ECHEVARRIA (1996b, p. 162), MORAES *et al.* (1998, p.427) e OLIVEIRA *et al.* (1999, p.494), que encontraram baixa prevalência destes gêneros de parasitos em ovinos.

GRÁFICO 8 – PREVALÊNCIA DE GÊNEROS DE HELMINTOS ENCONTRADOS NAS CULTURAS DE FEZES DAS OVELHAS, NOS MESES DE JULHO DE 1998 (a), SETEMBRO DE 1998 (b), MARÇO DE 1999 (c) E MAIO DE 1999 (d), BEM COMO NA PERCENTAGEM DO TOTAL DE LARVAS RECUPERADAS (e).



Larvas de *Stongyloides papillosus* foram assinaladas em todas as coproculturas realizadas, mas não foram incluídas no cálculo percentual porque este parasito é capaz de se reproduzir em vida livre. Nos períodos de baixo parasitismo, poucas ou nenhuma larva de estrongilídeo foram recuperadas.

## 5.4 ACOMPANHAMENTO IMUNOLÓGICO DAS OVELHAS

### 5.4.1 Número de eosinófilos sanguíneos

O número de eosinófilos periféricos apresentou-se alto no mês de novembro, com média de  $762,18 \pm 618,49$  eosinófilos por  $\text{mm}^3$  de sangue (GRÁFICO 9; TABELA 4). A média de eosinófilos do lote se manteve constante de dezembro a março. Concomitante ao pico de parasitismo de 30 de março, foi observada uma queda no número de eosinófilos circulantes, com média de  $410,62 \pm 178,82$  células por  $\text{mm}^3$ . Após o tratamento anti-helmíntico, foi observada uma recuperação no nível sanguíneo de eosinófilos, seguida por uma acentuada queda. Esta queda foi registrada na última coleta do acompanhamento e atingiu a média de  $302,50 \pm 116,78$  eosinófilos por  $\text{mm}^3$ .

O comportamento médio dos eosinófilos periféricos no lote de fêmeas acompanhadas revelou uma queda no pico de parasitismo, com recuperação subsequente. Esta queda pode estar associada à migração dos eosinófilos do sangue para a mucosa gastrintestinal, fenômeno que ocorre em resposta à liberação de IL-5 pelo estímulo parasitário (TIZARD, 1998, p.365).

A queda do número de eosinófilos circulantes observada na coleta de 25 de maio pode estar associada à imuno-depressão peripuerperal, uma vez que a maioria dos animais acompanhados encontrava-se no último mês de gestação.



GRÁFICO 9 – MÉDIA DE EOSINÓFILOS POR MILÍMETRO CÚBICO DE SANGUE E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS, DURANTE O PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999

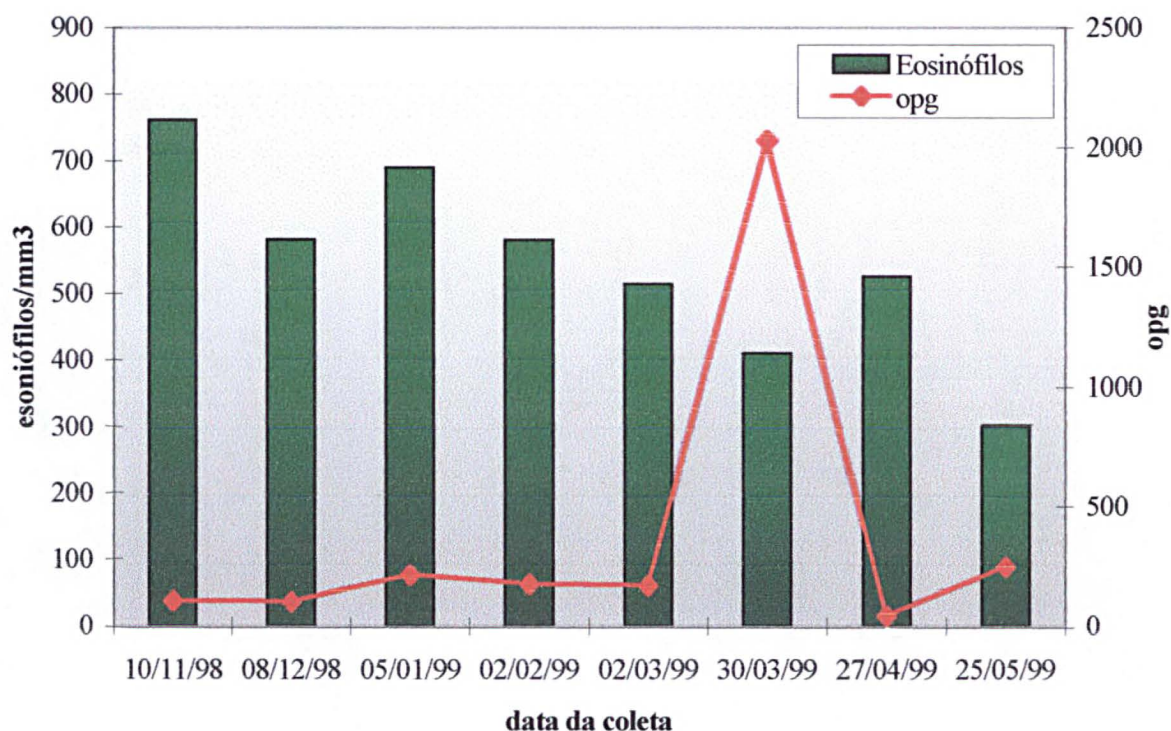


TABELA 4 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE EOSINÓFILOS CIRCULANTES DAS OVELHAS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999

COLETA	DATA	MÉDIA EOSINO <sup>(1)</sup>	DESVIO EOSINO <sup>(1)</sup>	MÉDIA LOG (EOSINO) <sup>(2)</sup>	DESVIO LOG (EOSINO)
1	10/11/98	762,185	618,493	2,771 c	0,311
2	08/12/98	581,408	331,864	2,688 bc	0,275
3	05/01/99	690,158	527,077	2,725 bc	0,335
4	02/02/99	580,467	270,978	2,701 bc	0,234
5	02/03/99	514,217	217,727	2,671 bc	0,195
6	30/03/99	410,622	178,825	2,570 ab	0,203
7	27/04/99	525,622	227,303	2,684 bc	0,178
8	25/05/99	302,427	116,784	2,445 a	0,191

(1) células por mm<sup>3</sup>

(2) agrupadas pelo teste de Duncan, p <0,05



#### 5.4.2 Densidade óptica para pesquisa de IgG anti-*Haemonchus contortus*

No início do acompanhamento, a média de densidade óptica para IgG anti-H.c. de  $0,408 \pm 0,092$  (GRÁFICO 10; TABELA 5). Um pequeno aumento nesta média é observado em dezembro, com os valores se mantendo constantes até o mês de abril. No mês de maio é observada uma queda acentuada nos valores de DO para IgG anti-H.c., atingindo a média de  $0,324 \pm 0,078$ .

É possível que a baixa média de DO para IgG específica observada no mês de novembro esteja relacionada com a imuno-depressão inespecífica que ocorre nas fêmeas durante o período lactacional (HOUDJIK *et al.*, 2000, p.44). Como o desmame foi realizado no mês de outubro, o restabelecimento dos níveis normais de anticorpos séricos tenha se estabelecido somente após o mês de novembro. Outra explicação para a baixa DO observada na primeira coleta seria os níveis baixos de parasitismo dos animais, resultando em um insuficiente estímulo ao sistema imune.

A manutenção dos níveis de IgG específica durante os meses de verão e outono pode ser resultado da infecção constante dos animais com L<sub>3</sub> na pastagem. A queda destes níveis no mês de maio, tal qual a queda do número de eosinófilos periféricos, pode ser atribuída à imuno-depressão periparto.

GRÁFICO 10 – MÉDIA DE DENSIDADE ÓPTICA PARA IGG ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* (H.c.) E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS, DURANTE O PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999

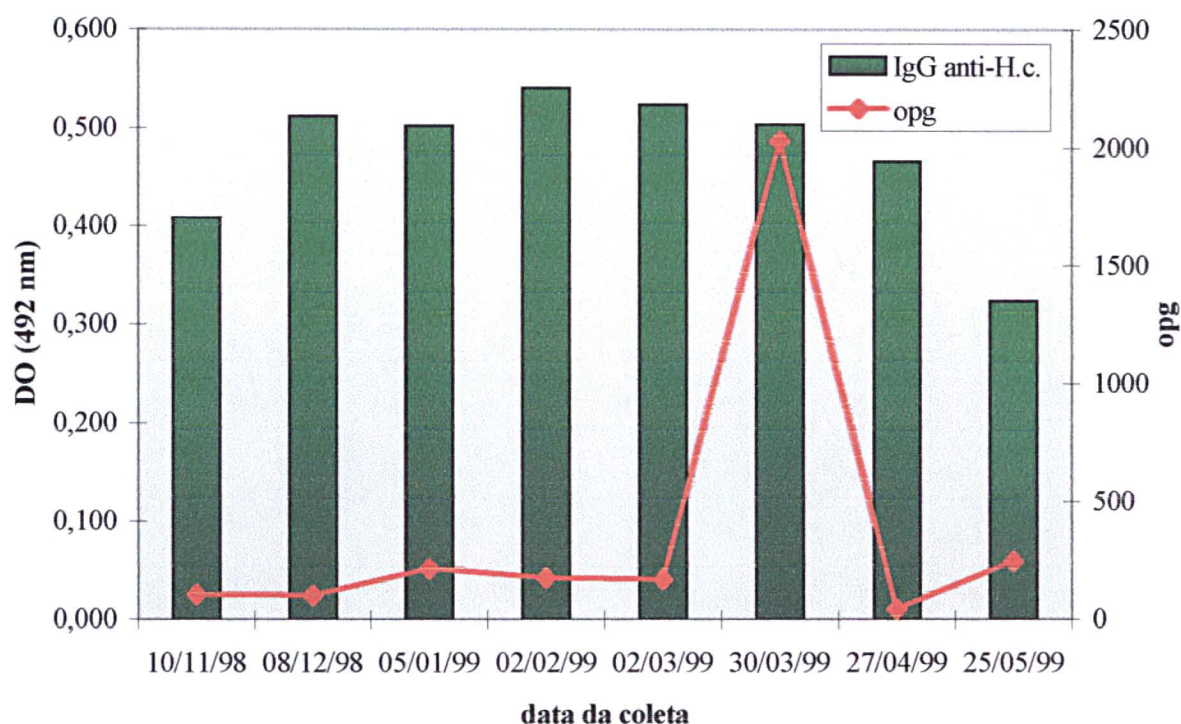


TABELA 5 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE DO PARA IgG ANTI- *HAEMONCHUS* DAS OVELHAS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999

COLETA	DATA	MÉDIA IGG <sup>(1)</sup>	DESVIO IGG <sup>(1)</sup>	MÉDIA LOG (IGG) <sup>(2)</sup>	DESVIO LOG (IGG)
1	10/11/98	0,408	0,092	-0,398 b	0,093
2	08/12/98	0,512	0,161	-0,315 bc	0,163
3	05/01/99	0,502	0,179	-0,327 bc	0,163
4	02/02/99	0,541	0,154	-0,283 c	0,125
5	02/03/99	0,524	0,121	-0,291 c	0,996
6	30/03/99	0,504	0,117	-0,310 bc	0,110
7	27/04/99	0,466	0,082	-0,338 bc	0,781
8	25/05/99	0,324	0,078	-0,502 a	0,110

(1) valores em DO

(2) agrupadas pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$

#### 5.4.3 IgE anti-*Haemonchus contortus*

A média das DO para IgE específica foi baixa no mês de novembro ( $0,462 \pm 0,574$ ), caindo mais ainda no mês de dezembro (GRÁFICO 11; TABELA 6). No mês de janeiro foi observado um pequeno aumento na média desta variável. De fevereiro a abril, a média de IgE específica se manteve elevada e constante. Em maio ocorreu nova queda nos valores de IgE anti-H.c., com valor médio de  $0,476 \pm 0,547$ .

Os valores baixos de IgE específica observados nas três primeiras coletas podem ser reflexo de uma baixa carga parasitária ou da imunossupressão lactacional. Se esta hipótese for verdadeira, a IgE específica é a última das variáveis imunológicas a restabelecer seus valores normais após a ovelha ser secada. Este restabelecimento ocorreria somente após longo período de desafio parasitário. É possível que a contaminação do pasto pelos animais jovens, somada às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do estágio infectante tenham proporcionado um nível de desafio parasitário necessário para a elevação da IgE sérica.

A queda no nível médio de IgE específica no mês de maio foi acompanhada de queda na média de outras variáveis imunológicas (IgG e eosinófilos periféricos). A diminuição nos níveis médios de todas as variáveis imunológicas na coleta do dia 25 de maio pode ser atribuída à imuno-depressão peri-parto, uma vez que a maior parte dos animais cursava o quinto mês gestacional.

GRÁFICO 11 – MÉDIA DE DENSIDADE ÓPTICA PARA IGE ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* (H.C.) E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DAS OVELHAS, DURANTE O PERÍODO DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999

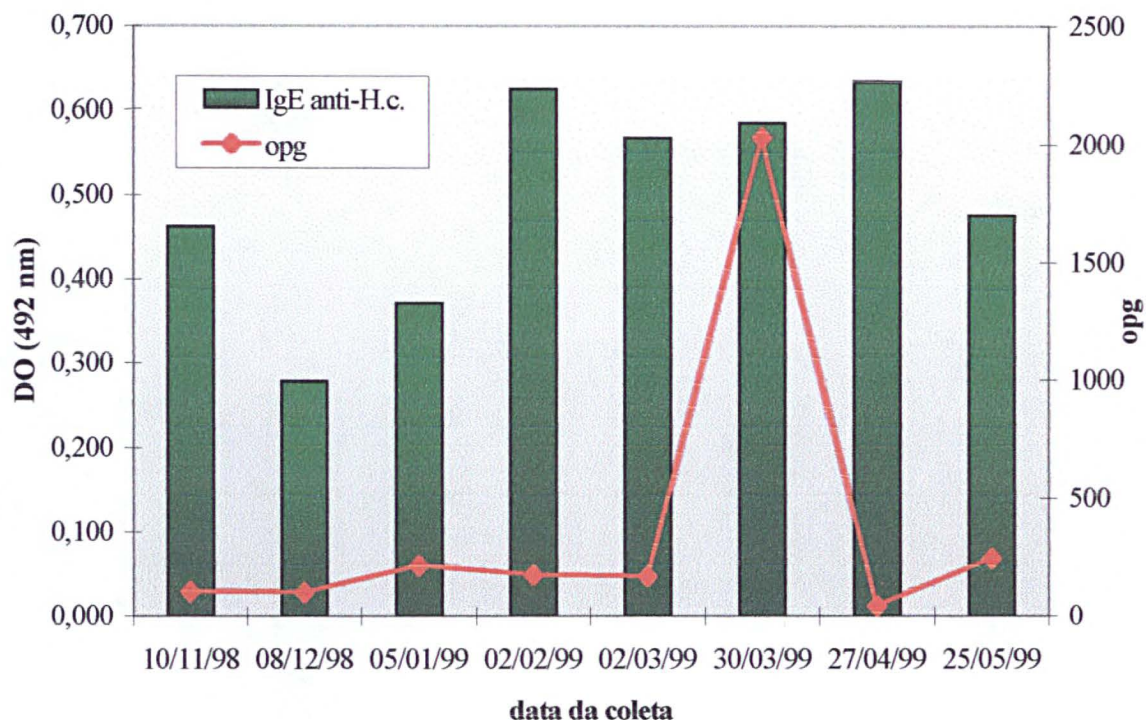


TABELA 6– MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE DO PARA IgE ANTI- *HAEMONCHUS* DAS OVELHAS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999

COLETA	DATA	MÉDIA IGE <sup>(1)</sup>	DESVIO IGE <sup>(1)</sup>	MÉDIA LOG (IGE+1) <sup>(2)</sup>	DESVIO LOG (IGE+1)
1	10/11/98	0,462	0,574	-0,696 ab	0,628
2	08/12/98	0,278	0,458	-1,062 a	0,727
3	05/01/99	0,371	0,489	-0,763 ab	0,564
4	02/02/99	0,625	0,584	-0,441 b	0,526
5	02/03/99	0,567	0,604	-0,517 b	0,545
6	30/03/99	0,585	0,591	-0,493 b	0,551
7	27/04/99	0,633	0,604	-0,427 b	0,498
8	25/05/99	0,476	0,547	-0,615 ab	0,560

(1) valores em DO

(2) agrupadas pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$

## 5.5 ANÁLISE DE CORRELAÇÕES

Quando os dados de opg, eosinófilos, IgE total, IgE e IgG específicas de todas as coletas são correlacionados entre si, observa-se que tanto eosinófilos quanto IgE tendem a ser correlacionados negativamente com o opg (TABELA 7). Todas as demais correlações foram positivas, sendo significativas as  $r_{(\text{opg}, \text{IgG})} = 0,13$ ;  $r_{(\text{IgE}, \text{EOSINO})} = 0,13$ ; e  $r_{(\text{IgG}, \text{IgE})} = 0,15$ .

TABELA 7 – CORRELAÇÕES DE SPEARMAN ENTRE OPG, EOSINÓFILOS CIRCULANTES, IgG E IgE ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* DAS OVELHAS, CONSIDERANDO TODAS AS COLETAS ENTRE NOVEMBRO DE 1998 E MAIO DE 1999

VARIÁVEL	OPG	EOSINO	IgE	IgG
OPG	1,0000	-0,2097 *	-0,0341	0,1310 +
EOSINO	-0,2097 *	1,0000	0,1331 +	0,0221
IgE	-0,0341	0,1331 +	1,0000	0,1554 *
IgG	0,1310 +	0,0221	0,1554 *	1,0000

+  $p < 0,10$ ; \*  $p < 0,05$

### 5.5.1 Correlações entre eosinófilos e opg

A análise de correlações entre dados de opg e eosinófilos de diferentes coletas mostrou uma tendência à negatividade. As correlações positivas obtidas foram fracas, abaixo do nível de significância adotado. Durante o período em que a média dos eosinófilos circulantes foi constante (coletas 2 a 5, correspondentes aos dias 08 de dezembro e 02 de março), foram consideradas significativas ( $p < 0,10$ ) as seguintes correlações:  $r_{(\text{EOSINO2}, \text{OPG8})} = -0,43$  ( $p = 0,0569$ );  $r_{(\text{EOSINO5}, \text{OPG3})} = -0,52$  ( $p = 0,0178$ );  $r_{(\text{EOSINO3}, \text{OPG8})} = -0,50$  ( $p = 0,0252$ );  $r_{(\text{EOSINO5}, \text{OPG8})} = -0,39$  ( $p = 0,0868$ ).

Os dados de eosinófilos da coleta 6, concomitante ao pico de parasitismo, foram correlacionados com o opg da mesma coleta ( $r_{(\text{EOSINO6}, \text{OPG6})} = -0,64$ ;  $p = 0,0023$ ); da terceira ( $r_{(\text{EOSINO6}, \text{OPG3})} = -0,73$ ;  $p = 0,0002$ ) e da última coleta ( $r_{(\text{EOSINO6}, \text{OPG6})} = -0,62$ ;

$p=0,0032$ ). Outra correlação significativa obtida foi a  $r_{(\text{EOSINO7}, \text{OPG8})}=-0,48$ , com  $p=0,0307$ .

### 5.5.2 Correlações entre IgG anti-*Haemonchus contortus* e opg

A análise da correlação entre IgG e opg de todas as coletas mostrou-se positiva e significativa para  $p<0,10$  (TABELA 7). Contudo, a análise de correlação entre algumas coletas mostrou uma tendência à negatividade. As seguintes correlações foram consideradas significativas:  $r_{(\text{IgG1}, \text{OPG4})} = 0,57$  ( $p=0,0082$ );  $r_{(\text{IgG7}, \text{OPG4})} = 0,46$  ( $p=0,0404$ );  $r_{(\text{IgG7}, \text{OPG7})} = 0,45$  ( $p=0,0439$ ); e  $r_{(\text{IgG8}, \text{OPG8})} = -0,49$  ( $p=0,0268$ ). Não foi observada correlação entre IgG e opg na 6.<sup>a</sup> coleta, correspondente ao pico de parasitismo.

A correlação positiva entre opg e IgG indica que quanto maior o grau de parasitismo, mais elevada é a resposta imune do animal. Isto ocorreu durante a maior parte do experimento, indicando que nos períodos de baixa parasitose a IgG específica é diretamente proporcional à carga parasitária. A inexistência de correlação entre IgG e opg no pico de parasitismo pode indicar que o aumento do desafio parasitário não seria acompanhado de uma resposta de IgG, ou que esta resposta não foi detectada nos intervalos de amostragem propostos neste estudo.

### 5.5.3 Correlações entre IgE anti-*Haemonchus contortus* e opg

Durante todo o acompanhamento, as correlações entre IgE específica e opg tenderam a ser negativas. Considerando-se um nível de significância de  $p<0,10$ , todas as correlações entre valores de IgE e opg da sétima coleta (após o pico de parasitismo) foram significativas, variando de  $-0,46$  a  $-0,61$ . No pico de parasitismo, a correlação obtida foi de  $r_{(\text{OPG6}, \text{IgE6})}=-0,12$  ( $p=0,6191$ ).

#### 5.5.4 Correlações entre eosinófilos e IgG anti-*Haemonchus contortus*

Ao longo do acompanhamento, foi observada mudança na tendência à positividade ou negatividade das correlações entre IgG e eosinófilos. Foram significativas para  $p < 0,10$  as seguintes correlações:  $r_{(\text{EOSINO3;IGG2})} = +0,47$  ( $p = 0,0385$ );  $r_{(\text{EOSINO6;IGG1})} = +0,42$  ( $p = 0,0628$ );  $r_{(\text{EOSINO6;IGG8})} = +0,39$  ( $p = 0,0855$ ) e  $r_{(\text{EOSINO7;IGG7})} = -0,38$  ( $p = 0,0959$ ). Não foi observada correlação entre IgG específica e eosinófilos periféricos por ocasião do pico de parasitismo (coleta 6).

#### 5.5.5 Correlações entre eosinófilos e IgE anti-*Haemonchus contortus*

Foram obtidas correlações positivas entre quase todas as coletas para as variáveis eosinófilos e IgE. As de maior nível de significância ocorreram na fase em que a média de eosinófilos permaneceu constante no lote de fêmeas acompanhado. Para os valores de eosinófilos da terceira coleta, as correlações com a IgE variaram de +0,41 a +0,51. Para os da quarta coleta, de +0,23 a +0,43.

No pico de parasitismo (coleta 6), a correlação entre eosinófilos e IgE foi de +0,25 ( $p = 0,2779$ ).

#### 5.5.6 Correlações entre IgG e IgE anti-*Haemonchus contortus*

As correlações entre coletas para IgG e IgE tenderam a ser altas e positivas durante a maior parte do acompanhamento. As poucas correlações negativas foram baixíssimas, com nível de significância próximo a zero. Somente as seguintes correlações foram consideradas significativas:  $r_{(\text{IGE1;IGG5})} = 0,50$  ( $p = 0,0242$ );  $r_{(\text{IGE3;IGG2})} = 0,39$  ( $p = 0,0896$ );  $r_{(\text{IGE3;IGG4})} = 0,43$  ( $p = 0,0604$ );  $r_{(\text{IGE3;IGG5})} = 0,40$  ( $p = 0,0804$ );  $r_{(\text{IGE5;IGG5})} = 0,45$  ( $p = 0,0462$ );  $r_{(\text{IGE8;IGG5})} = 0,47$  ( $p = 0,0378$ ). No pico de parasitismo, a correlação entre estas duas variáveis foi de  $r_{(\text{IGE6;IGG6})} = 0,19$  ( $p = 0,4312$ ).



Quando os dados totais de cada variável foram correlacionados, verificamos que o número de eosinófilos sanguíneos foi a variável que obteve melhor correlação com o marcador parasitológico. Também foi obtida boa significância quando foram correlacionados eosinófilos e opg de coletas diferentes, sobretudo entre as coletas em que a média de eosinófilos estava na fase de *plateau* e a de opg, no início da ascensão. Isto pode indicar um papel dos eosinófilos circulantes no controle da verminose fora dos períodos críticos, mantendo a parasitose em níveis toleráveis pelo hospedeiro. No pico de verminose, uma correlação de  $-0,64$  foi obtida entre eosinófilos periféricos e opg. Isso indica que o alto grau de parasitismo é diretamente responsável pela migração dos eosinófilos do sangue para a mucosa gastrintestinal.

Nível médio de correlação ( $r = -0,26$ ) entre eosinófilos e opg também foi detectado por WOOLASTON *et al.* (1996, p.124-125) após desafiar borregos de 13 meses de idade, submetidos a prévias infecções em nível de campo.

A relação observada entre IgG e opg não seria o esperado para animais adultos, com um padrão de resposta imune estabelecido contra os helmintos gastrintestinais. Uma vez estabelecido um grau de imunidade protetora, seria esperada uma correlação negativa entre estas características. Quanto maior o nível de anticorpos circulantes, menor seria o número de helmintos estabelecidos. Correlações negativas entre IgG específica e opg de nível médio a alto foram detectadas em vários estudos (DOUCH *et al.*, 1995, p. 128; BISSET *et al.*, 1996, p.258; DOUCH *et al.*, 1996, p. 905-908; SHAW *et al.*, 1999, p.30).

A correlação positiva entre IgG e opg obtidas neste estudo podem ser reflexo de uma provável seleção natural para “resiliência”. Embora não haja estudos sobre a resposta imune de animais “resilientes”, pode ser que os altos níveis de IgG indiquem a capacidade do organismo em reconhecer o agente agressor, mas não expulsá-lo.

A tendência a correlações negativas entre IgE específica e opg é esperada para animais adultos, com uma resposta imune estabelecida. Esta relação indica que quanto maior for o nível de IgE sérica, menor é o número de parasitos estabelecidos. A



intensificação da correlação entre estas variáveis na coleta logo após o tratamento anti-helmíntico pode indicar uma tendência natural de eliminação da carga parasitária. Se esta hipótese estivesse correta, seria possível que os animais apresentassem auto cura caso não tivessem recebido o tratamento anti-helmíntico.

Quando as três variáveis imunológicas foram correlacionadas entre si, o esperado seria correlações altas e positivas, uma vez que tanto eosinófilos, IgG e IgE aumentam em resposta ao estímulo parasitário. Isto foi observado nas relações entre IgE e eosinófilos, bem como IgG e IgE. Quando IgG e eosinófilos foram correlacionados, houveram várias correlações negativas entre as coletas. Além disso, maior parte das correlações obtidas foram fracas, muito longe do nível de significância adotado. PERNTHANER *et al.* (1995, p.526-527) também encontraram mudanças nas tendências das correlações com eosinófilos ao longo do acompanhamento.

Os baixos valores de correlação obtidos entre as variáveis estudadas, bem como a resposta atípica obtida para os valores de IgG, pode ser decorrente da heterogeneidade de resposta imune do lote. Considerável variação na expressão da imunidade dos ovinos aos helmintos gastrintestinais foi observada em vários estudos (STEAR *et al.*, 1995, p.649; SHAW *et al.*, 1997, p.263; GÓMEZ-MUÑOZ *et al.*, 1998, p.457). No presente trabalho, a variabilidade pode ter sido evidenciada devido à utilização de infecção natural, à baixa amostragem do lote e às diferenças de idade e de raça entre os animais.

## 5.6 SELEÇÃO DAS OVELHAS

### 5.6.1 Repetibilidade dos marcadores para a seleção de ovelhas resistentes ao parasitismo

Para estimativa da repetibilidade dos marcadores estudados, trabalhou-se inicialmente com os dados de todas as coletas. A fim de verificar se esta medida aumentaria em intervalos mais curtos de amostragem, foi calculada a repetibilidade de todas as coletas com exceção da primeira e da última coleta, ou somente da primeira.

Os valores de repetibilidade obtidos para o Log (opg+1) foram muito baixos em todas as hipóteses (TABELA 8). Quando foi excluída a primeira coleta, cujos valores foram nulos para todos os animais, a R foi de 0,25. O log(IgE) foi o marcador de maiores índices de repetibilidade, que variou de 0,77 a 0,81. O logaritmo dos eosinófilos apresentou repetibilidade intermediária entre o log(IgE) e o log(IgG). O log(IgG) foi o marcador imunológico de menores repetibilidades, sendo que a R para todas as coletas foi de 0,28. Quando são excluídas a primeira e a última coleta, nas quais as menores médias de IgG foram observadas, a repetibilidade da característica subiu para 0,58.

A baixa repetibilidade calculada para o opg indica que os dados individuais obtidos fora dos períodos críticos não são preditivos dos valores que cada animal apresenta durante o pico de verminose. Portanto, é imprescindível que os dados de opg utilizados em um programa de seleção incluam valores referentes a picos de parasitismo.

TABELA 8 – REPETIBILIDADES (R) E DESVIOS PADRÕES DA REPETIBILIDADE ( $S_{(R)}$ ) OBTIDOS PARA AS VARIÁVEIS UTILIZADAS COMO MARCADORES PARA A SELEÇÃO DE ANIMAIS RESISTENTES ÀS PARASITOSES, CONSIDERANDO k COLETAS DE DADOS DAS OVELHAS

AGRUPAMENTO	VARIÁVEL	k	R	$S_{(R)}$
Todas as coletas	Log(OPG+1)	8	0,1797	0,0887
	Log(EOSINO)	8	0,4638	0,1348
	Log(IgE)	8	0,8171	0,1246
	Log(IgG)	8	0,2774	0,1084
Excluindo a 1ª coleta	Log(OPG+1)	7	0,2506	0,1085
	Log(EOSINO)	7	0,4603	0,1384
	Log(IgE)	7	0,7978	0,1303
	Log(IgG)	7	0,3147	0,1197
Excluindo a 1ª e a última coleta	Log(OPG+1)	6	0,2277	0,1113
	Log(EOSINO)	6	0,5207	0,1478
	Log(IgE)	6	0,7739	0,1372
	Log(IgG)	6	0,5800	0,1497

Os marcadores imunológicos apresentaram maior repetibilidade que o parasitológico (opg) em todas as hipóteses avaliadas. Como os dados individuais tendem a se repetir em até 52% (no caso do eosinófilo), 81% (IgE) ou 58% (IgG), estes marcadores seriam mais seguros para identificar animais “*high responders*” à infecção parasitária, mesmo fora do período crítico. Isso é de grande valia para a seleção em rebanhos de alto valor zootécnico, nos quais é indesejado um nível de desafio parasitário elevado, com risco de óbito.

DOUCH *et al.* (1995, p.128) encontraram repetibilidade de 0,15 e 0,35 para o opg de dois rebanhos em seleção. Os valores de repetibilidade para IgG foram de 0,42 e 0,33, respectivamente. SHAW *et al.* (1999, p.29) analisaram os dados de IgE específica destes mesmos rebanhos, obtidos no mesmo período, obtendo índices de repetibilidade de 0,45 e 0,48. Estes dados confirmam a tendência dos dados imunológicos serem mais constantes que o opg em um mesmo animal.

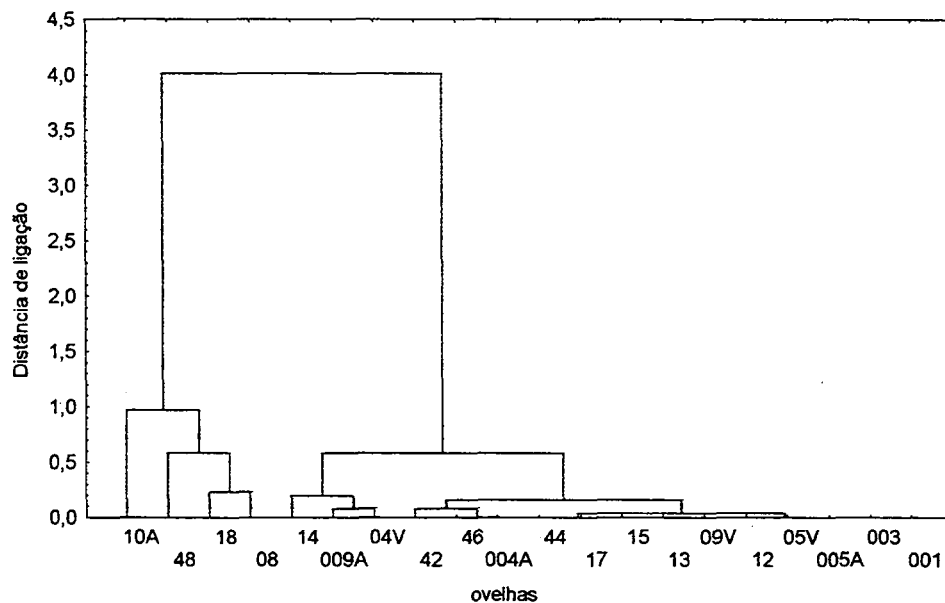
### 5.6.2 Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis à parasitose gastrointestinal com base no marcador parasitológico (opg)

Para a análise de *cluster*, foram elaboradas três hipóteses de agrupamento baseadas no opg:

- 1 – Dados de opg de todas as coletas
- 2 – Dados de opg da coleta 6 (pico de parasitismo de outono)
- 3 – Dados de opg das coletas 5 e 6

As três hipóteses resultaram em *clusters* muito semelhantes, capazes de identificar o mesmo grupo resistente, composto por 16 animais, e o mesmo grupo susceptível, composto por quatro fêmeas (GRÁFICO 12).

GRÁFICO 12 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DA COLETA DE 30 DE MARÇO DE 1999, CORRESPONDENTE AO PICO DE PARASITISMO DE OUTONO

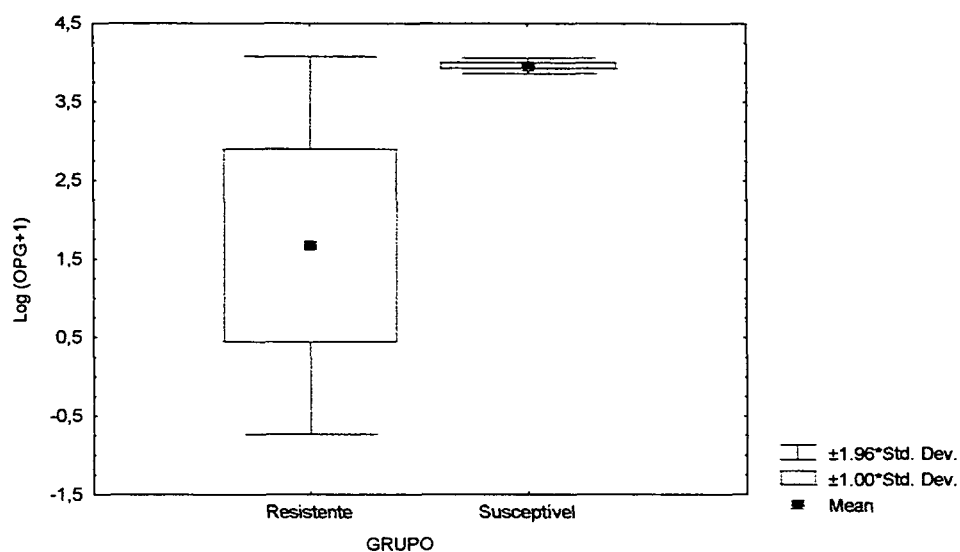


NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

O teste t sobre os grupos resistente e susceptível mostrou que o logaritmo do opg das coletas 2, 3 e 6 (pico de parasitismo) e do número de eosinófilos sanguíneos das coletas 5 e 6 foram diferentes entre os grupos, para  $p < 0,05$  (ANEXO IV). Não foi observada diferença significativa entre os grupos para os logaritmos de IgE e IgG específica.

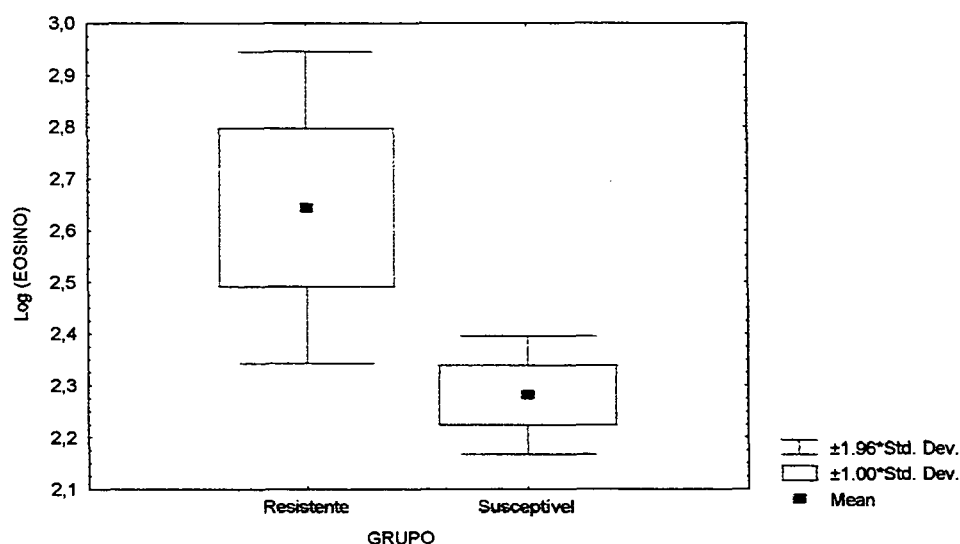
A análise da distribuição das variáveis por grupo na coleta coincidente com o pico de parasitismo revelou que o grupo dos animais susceptíveis apresentou maior média de Log (opg+1) (GRÁFICO 13) e menor média de log (eosino) (GRÁFICO 14). Quando o logaritmo da DO para IgE específica foi analisado, foi observada grande variabilidade de respostas dentro de ambos os grupos (GRÁFICO 15). Entretanto, foi observada uma tendência do grupo susceptível em apresentar uma média de IgE mais baixa que a do grupo resistente. Os valores de logaritmo da DO para IgG específica foram também muito variáveis, sobretudo no grupo dos animais resistentes. O grupo susceptível teve menor discrepância de dados e tendência a uma maior média que o grupo resistente.

GRÁFICO 13 – DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DO LOGARITMO DECIMAL DO NÚMERO DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES MAIS UMA UNIDADE ( $\text{Log}(\text{OPG}+1)$ ) DA COLETA DE 30 DE MARÇO DAS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO RESISTENTES OU SUSCEPTÍVEIS PELO MARCADOR PARASITOLÓGICO (OPG)



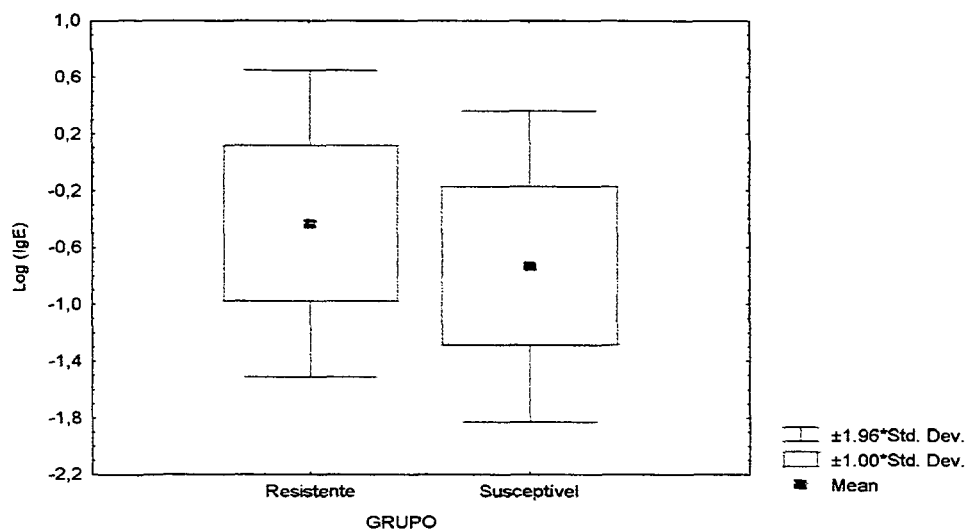
NOTA: Mean, média. Std. Dev., desvio padrão.

GRÁFICO 14 – DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DO LOGARITMO DECIMAL DO NÚMERO DE EOSINÓFILOS POR MILÍMETRO CÚBICO DE SANGUE ( $\text{Log}(\text{EOSINO})$ ), PROVENIENTE DA COLETA DE 30 DE MARÇO, DAS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO RESISTENTES OU SUSCEPTÍVEIS PELO MARCADOR PARASITOLÓGICO (OPG)



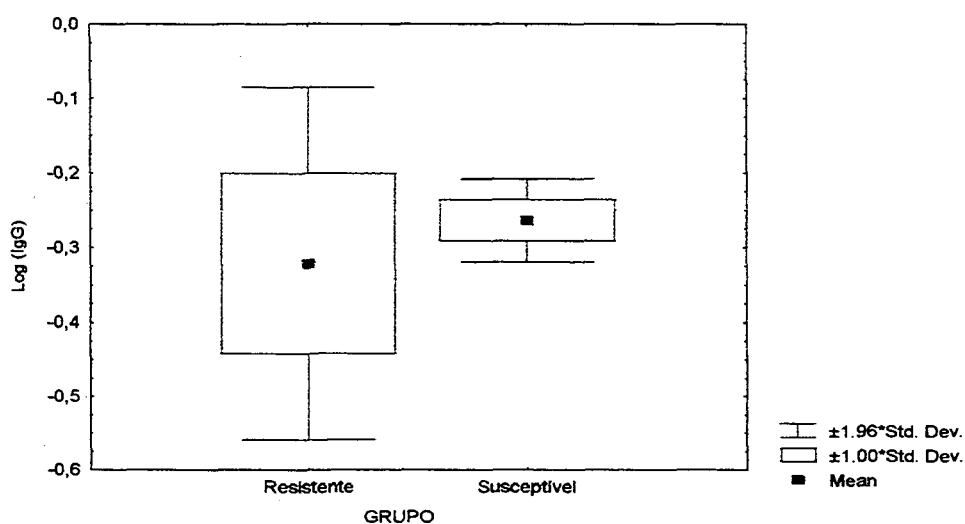
NOTA: Mean, média. Std. Dev., desvio padrão.

GRÁFICO 15 – DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DO LOGARITMO DECIMAL DA DENSIDADE ÓPTICA PARA IgE ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* (Log (IgE)), PROVENIENTE DA COLETA DE 30 DE MARÇO, DAS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO RESISTENTES OU SUSCEPTÍVEIS PELO MARCADOR PARASITOLÓGICO (OPG)



NOTA: Mean, média. Std. Dev., desvio padrão.

GRÁFICO 16 – DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DO LOGARITMO DECIMAL DA DENSIDADE ÓPTICA PARA IgG ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* (Log (IgG)), PROVENIENTE DA COLETA DE 30 DE MARÇO, DAS OVELHAS CLASSIFICADAS COMO RESISTENTES OU SUSCEPTÍVEIS PELO MARCADOR PARASITOLÓGICO (OPG)



NOTA: Mean, média. Std. Dev., desvio padrão.

### 5.6.3 Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis à parasitose gastrointestinal com base em mais de um marcador

Para a seleção das ovelhas baseada em mais de um marcador, foram comparadas as seguintes hipóteses:

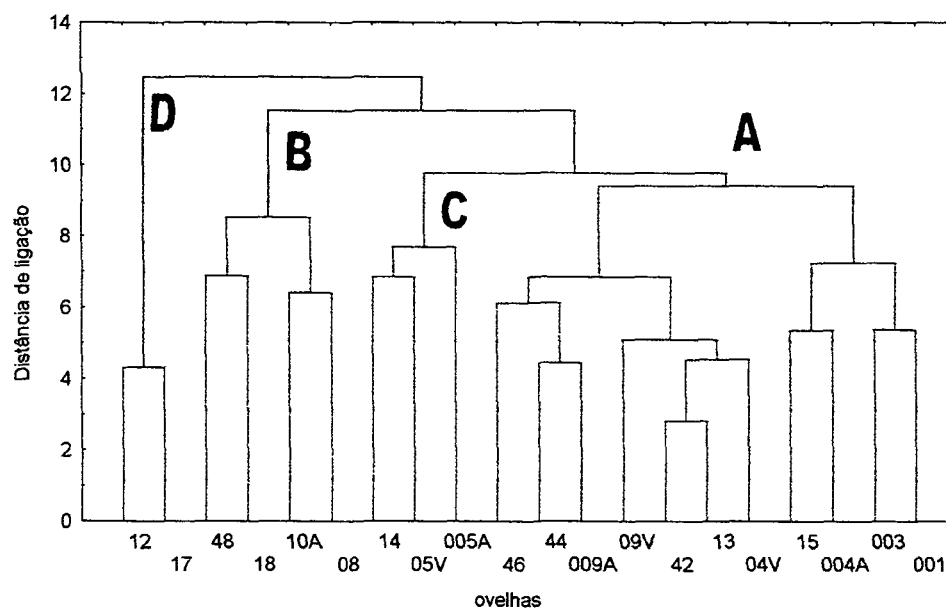
- 1- Dados de opg, eosinófilos sanguíneos, IgE e IgG de todas as coletas;
- 2- Dados de opg, eosinófilos sanguíneos, IgE e IgG da coleta 6 (pico de parasitismo);
- 3- Dados de opg e eosinófilos da coleta 6;
- 4- Dados de opg e IgE da coleta 6;
- 5- Dados de opg e IgG da coleta 6

Quando os dados obtidos em todas as coletas foram submetidas à análise de *cluster*, quatro grupos foram obtidos (GRÁFICO 17). O grupo A foi composto por 13 que apresentaram baixo opg. Portanto, este grupo corresponderia ao grupo resistente. Os animais que foram excluídos deste grupo apresentavam valores individuais elevados para uma das variáveis utilizada para a construção do dendrograma. O grupo B compreendeu animais cujos valores de opg foram muito elevados. Da mesma forma, o grupo C compreendeu elevados valores de eosinófilos e o D, valores elevados de IgE. Assim, o grupo B foi considerado o de animais susceptíveis; D e C, de animais altamente resistentes.

Quando trabalhamos apenas com as variáveis obtidas na coleta 6, houve formação de dois grupos distintos (GRÁFICO 18). O grupo A compreendeu 16 animais de baixo opg. Sendo por isso, considerado resistente. Separado do grupo A ao nível da distância euclidiana 4,13, o grupo B compreendeu quatro animais de altos valores de opg. Por isso, o grupo B foi considerado susceptível.

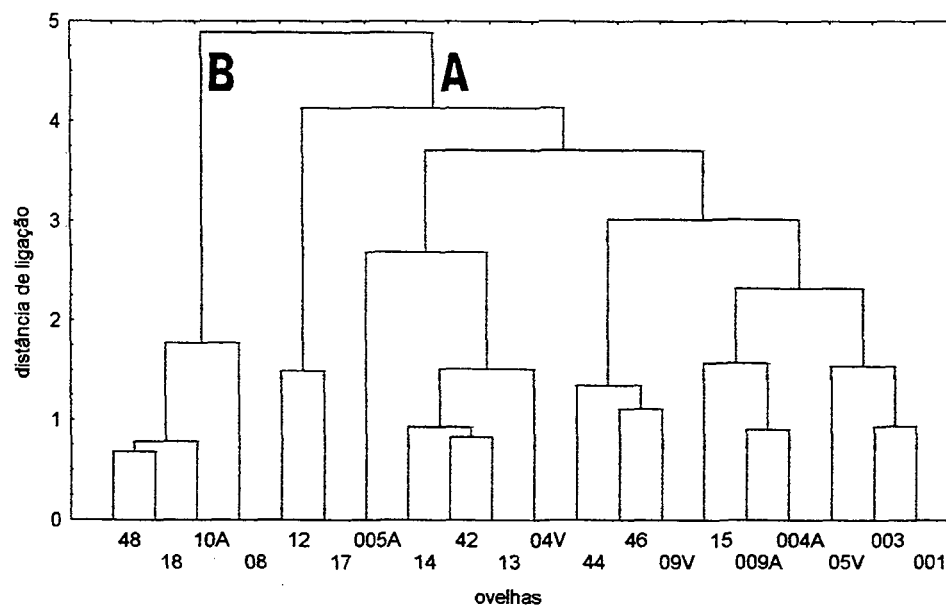


GRÁFICO 17 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES, EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE E IGG ANTI - *HAEMONCHUS CONTORTUS* DE TODAS AS COLETAS DAS OVELHAS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

GRÁFICO 18 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES, EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE E IGG ANTI - *HAEMONCHUS CONTORTUS* DA SEXTA COLETA DAS OVELHAS,



REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999

NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

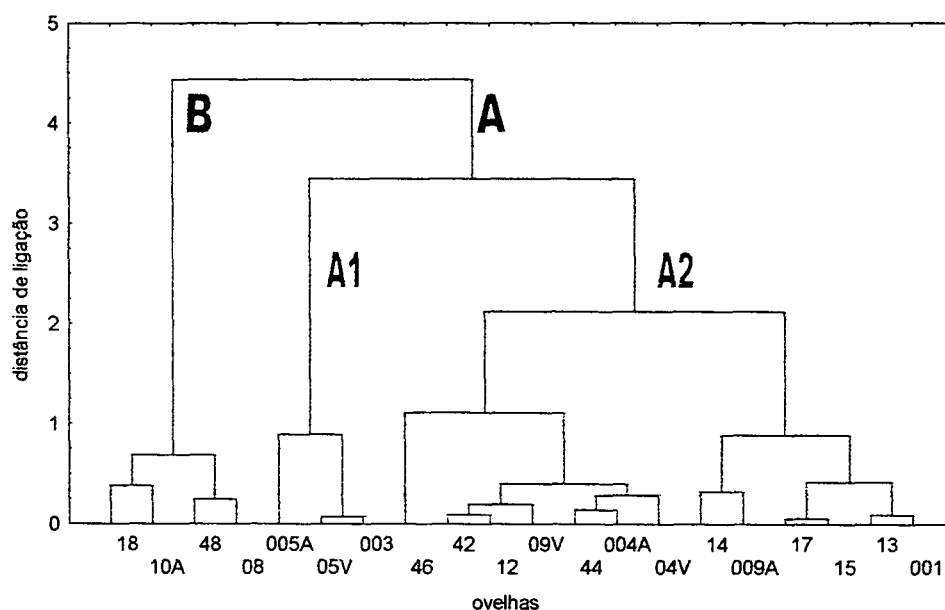
No *cluster* formado com os dados de opg e eosinófilos da sexta coleta, houve ocorrência de dois grupos ao nível de 4,43 de distância euclidiana (GRÁFICO 19). O

grupo A compreendeu 16 animais cujos valores de opg foram baixos; portanto, este foi o grupo resistente. Este grupo apresentou uma subdivisão ao nível de 3,44 de distância euclidiana, formando os subgrupos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>. Os animais do subgrupo A<sub>1</sub> foram excluídos de A<sub>2</sub> por apresentarem número muito alto de eosinófilos circulantes. Este foi o grupo altamente resistente. O grupo B foi considerado o grupo susceptível, pois compreendeu quatro animais cujos valores de opg foram os mais elevados e os de eosinófilos, os mais baixos.

Quando os valores de opg e DO para IgE específica foram submetidos à análise de *cluster*, foram obtidos dois grupos distintos, unidos na distância euclidiana de 3,52 (GRÁFICO 20). O grupo A foi considerado resistente por reunir animais cujos valores de opg foram baixos. Este grupo foi subdividido em dois subgrupos: A<sub>1</sub>, com valores baixos de IgE, e A<sub>2</sub>, com valores elevados de IgE. O grupo B, considerado susceptível, compreendeu quatro animais cujos valores de opg foram muito elevados e os de IgE, baixos. A análise de *cluster* excluiu dois animais, o 12 e o 17, que apresentaram valores altíssimos para IgE específica.

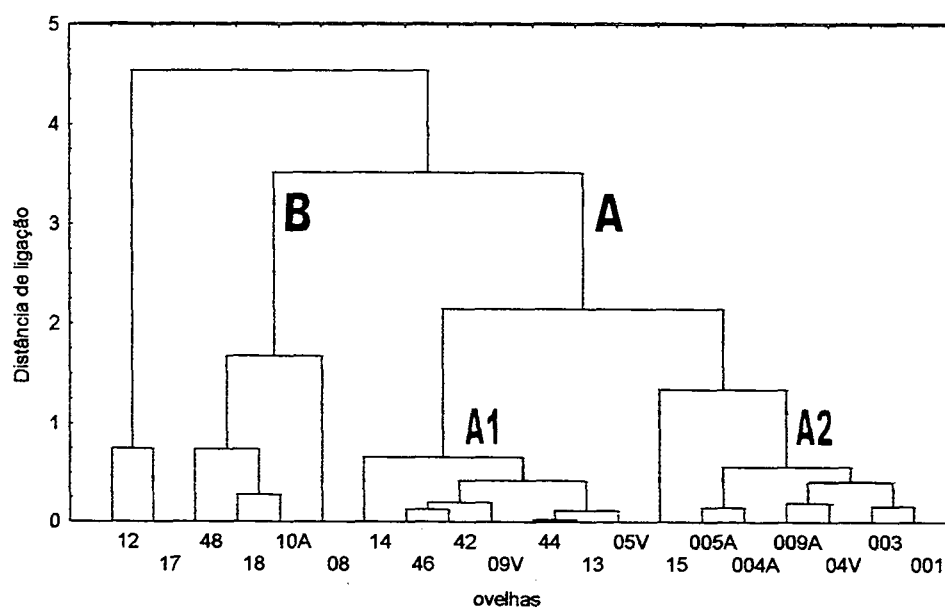
A última hipótese, que compreendeu um agrupamento a partir dos valores de opg e IgG para a coleta 6, resultou em dois grupos (GRÁFICO 21). O grupo A, que compreendeu os animais de alta IgG, foi subdividido em dois subgrupos. O subgrupo A<sub>1</sub> compreendeu os animais cujos valores de opg foram elevados (susceptíveis) e o A<sub>2</sub>, animais com valores baixos de opg. O grupo B compreendeu animais de baixa IgG. Como os grupos primários formados (A e B) mantinham animais de baixo opg, não se pôde obter grupos resistentes e susceptíveis bem formados.

GRÁFICO 19 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES E EOSINÓFILOS SANGÜÍNEOS DA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999



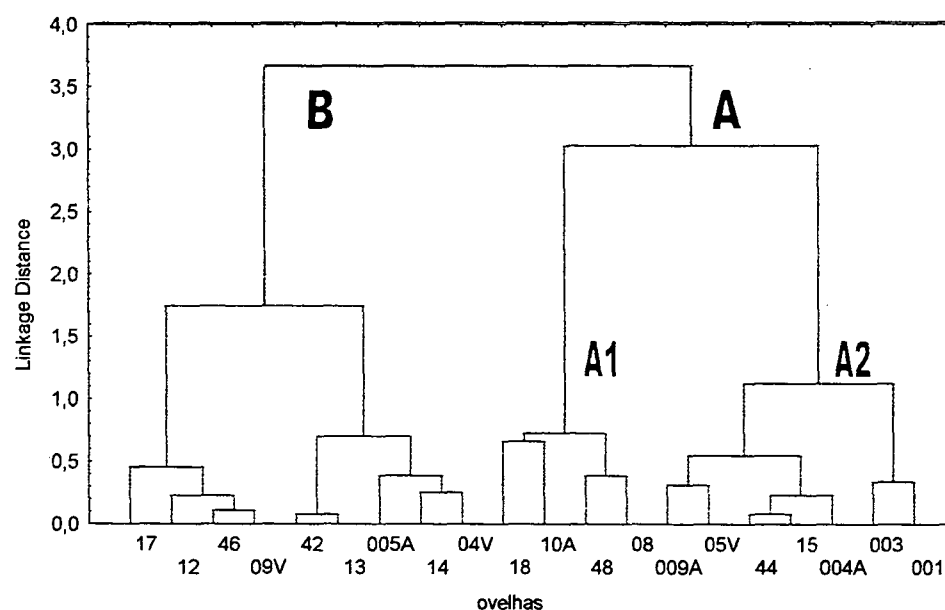
NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

GRÁFICO 20 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES E IGE ANTI - *HAEMONCHUS CONTORTUS* DA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

GRÁFICO 21 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES E IGG ANTI - *HAEMONCHUS CONTORTUS* DA SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADA EM 30 DE MARÇO 1999



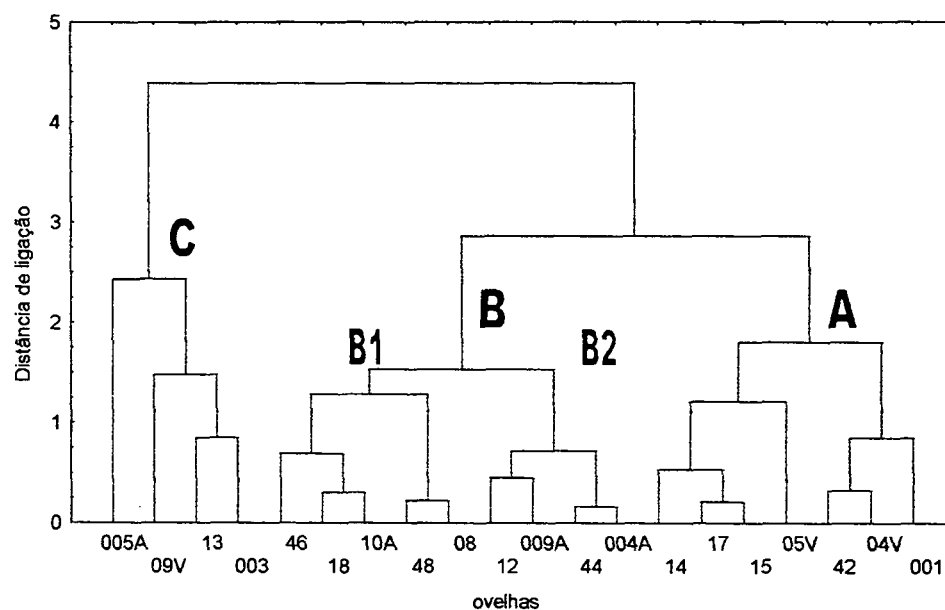
NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

#### 5.6.4 Classificação das ovelhas em resistentes e susceptíveis com base em marcadores imunológicos

Afim de observar o comportamento dos marcadores imunológicos como ferramentas de seleção indireta para animais resistentes (de baixo opg), os valores de eosinófilos, IgE e IgG específica foram submetidos à análise de *cluster*. Para cada variável foram construídos dois *clusters*, um relacionando dados do pico de parasitismo (coleta 6) com a coleta imediatamente anterior (coleta 5), e outro com a coleta imediatamente posterior (coleta 7).

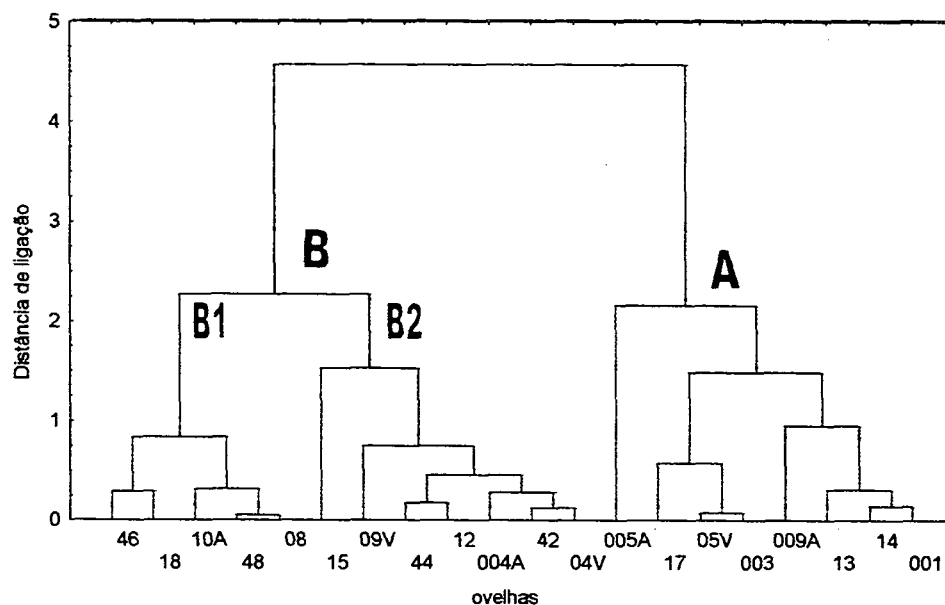
Tanto para IgG quanto para IgE específica, nenhum *cluster* foi capaz de reunir os animais susceptíveis em um mesmo grupo (ANEXO V). Nas duas hipóteses formuladas para os eosinófilos, os quatro animais considerados susceptíveis pelo opg foram incluídos no grupo de menores valores para eosinófilos, assinalado como B<sub>1</sub> (GRÁFICO 22 e 23).

GRÁFICO 22 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE EOSINÓFILOS POR  $\text{MM}^3$  DE SANGUE DA SEXTA E SÉTIMA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADAS EM 30 DE MARÇO E 27 DE ABRIL DE 1999, RESPECTIVAMENTE



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

GRÁFICO 23 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE EOSINÓFILOS POR  $\text{MM}^3$  DE SANGUE DA QUINTA E SEXTA COLETA DAS OVELHAS, REALIZADAS EM 02 E EM 30 DE MARÇO DE 1999, RESPECTIVAMENTE



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

A análise de cluster se mostrou como um método eficaz de agrupamento dos animais em resistentes e susceptíveis, conforme já havia sido demonstrado por SOTOMAIOR (1997, p. 79-95); SCHMIDT (2000, p. 81-82) e SCHMIDT *et al.* (2001, p.57-63). Quando o opg foi utilizado como marcador, 80% do lote acompanhado foi enquadrado no grupo resistente. Isto era esperado, uma vez que a população parasito tende a apresentar uma distribuição desigual entre hospedeiros, com a predominância de animais com baixa carga parasitária (BISSET *et al.*, 2001, p.2).

O uso de mais de um marcador concomitantemente tem o objetivo de enquadrar animais dentro dos grupos resistente e susceptível com maior acurácia. Isto é útil quando o objetivo de seleção é o descarte de animais susceptíveis e a manutenção do maior número possível de fêmeas resistentes no plantel. Quando mais de um marcador foi utilizado para a seleção dos animais, observou-se que o grupo susceptível era o mesmo formado em todas as hipóteses analisadas, exceto no agrupamento a partir do opg e da IgG específica. Assim, tanto o número de eosinófilos circulantes quanto a DO para IgE específica poderiam ser utilizados como marcadores juntamente com o opg. Neste caso, o uso da IgE seria mais vantajoso, uma vez que o teste de enzima-imunoensaio apresenta a leitura automatizada, permite a estocagem das amostras por longos períodos e a análise de um grande número de animais ao mesmo tempo (DOUCH *et al.*, 1995, p.127).

O uso isolado de um marcador imunológico para identificação de animais resistentes somente foi possível com o eosinófilo. Isto já era esperado, uma vez que o número de eosinófilos sanguíneos foi a variável imunológica que teve maior correlação com o opg ( $r=-0,21$ ) e o único marcador imunológico que mostrou diferenças significativas na média do grupo resistente e susceptível. A seleção indireta baseada nos eosinófilos seria interessante, uma vez que este marcador apresentou uma repetibilidade bem maior que a do opg. Como os valores de eosinófilos permaneceram 46% constantes entre todas as coletas realizadas, a amostragem do lote poderia ser realizada a qualquer momento do período seco das ovelhas, sem necessidade de

esperar o pico de verminose. Entretanto, WOOLASTON *et al.* (1996, p.125) desaconselha a seleção indireta pelo eosinófilo pelo fato da técnica de contagem ser trabalhosa e pela característica de apresentar menor herdabilidade que o opg.

A densidade óptica para IgG anti-H.c. mostrou-se muito variável entre os animais acompanhados, sobretudo naqueles classificados como resistentes pelo opg. Considerável variação na resposta imune dos ovinos aos helmintos gastrintestinais também foi relatada por outros autores (STEAR *et al.*, 1995, p.649; SHAW *et al.*, 1997, p.263; GÓMEZ-MUÑOZ *et al.*, 1998, p.457). A variabilidade do comportamento da IgG anti-H.c. observada neste trabalho impediu seu uso como caráter de identificação de animais resistentes à verminose, uma vez que tanto animais de alto quanto de baixo opg apresentaram altos níveis séricos de IgG específica.

A falência em identificar indivíduos resistentes indiretamente pelos níveis de IgG anti-H.c. no rebanho estudado não era esperada, tendo em vista a existência de programas de seleção de ovinos resistentes às parasitoses baseados nesta característica. Segundo DOUCH *et al.* (1995, p.130), a seleção indireta pela IgG teria 51-67% da eficiência da seleção direta pelo opg. Contudo, a maior parte das pesquisas relacionadas à seleção indireta de animais para resistência às parasitoses são realizadas com dados de rebanhos previamente selecionados. DOUCH *et al.* (1995, p.124) encontraram maiores diferenças no nível de IgG sérica entre grupos de grande distância genética, ou seja, linhas de animais susceptíveis e resistentes selecionadas por várias gerações. É possível que quando se pretende identificar animais resistentes a partir de um rebanho comum, que não tenha sido pré-selecionado, a resposta imune seja mais variável dentro de um mesmo grupo. McEWAN *et al.* (1994 *apud* DOUCH *et al.* 1996, p. 908) estudaram a progênie de dez carneiros, cinco com os maiores níveis de IgG anti-*Trichostrongylus colubriformis* de um rebanho “comum” (grupo “*high responder*”); cinco com os menores (grupo “*low responder*”). A progênie do grupo *high responder* mostrou maiores níveis de IgG específica sérica, bem como maior ganho de peso. Entretanto, não foi observada divergência entre o opg das duas linhas.

Isso pode indicar uma menor relação entre IgG e opg em rebanhos que não tenham sido previamente selecionados para resistência.

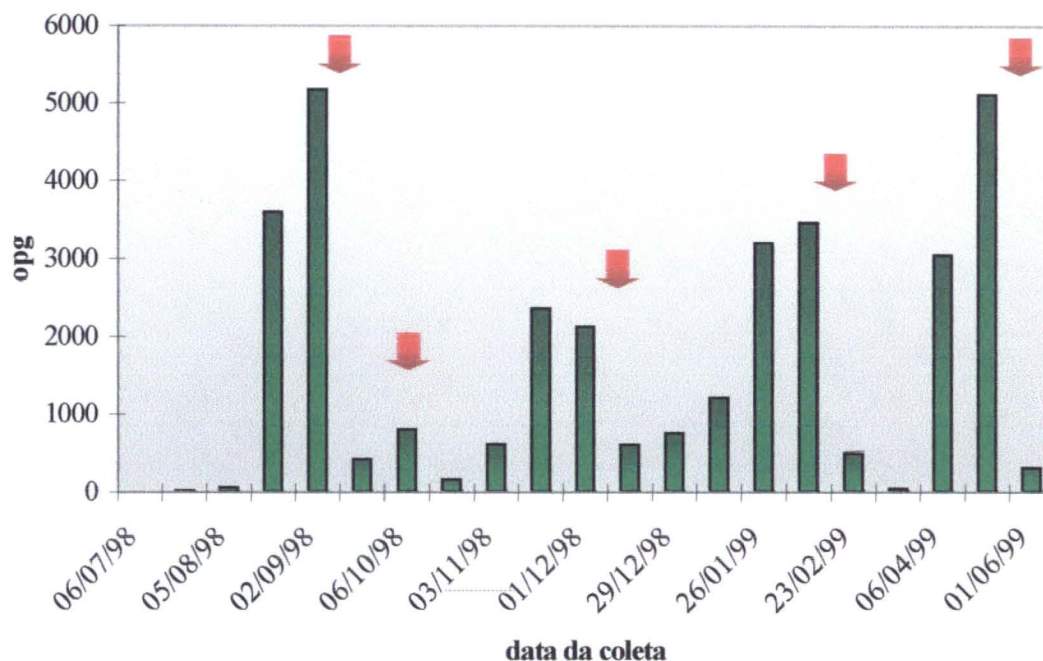
## 5.7 ACOMPANHAMENTO PARASITOLÓGICO DOS CORDEIROS

Nos exames coprológicos, foi observada a presença de ovos de parasitos da superfamília Strongyloidea (ovos strongiliformes e de *Nematodirus sp.*), de *Strongyloides papillosus*, de *Moniezia sp.* e oocistos de *Eimeria spp.* A média total de opg revelou um aumento abrupto no mês de agosto, atingindo a média de  $5.179,17 \pm 3724,30$  opg (GRÁFICO 24). Como os cordeiros pastavam junto a suas mães nos piquetes, o crescimento abrupto do número de opg poderia ser atribuído à ingestão de forragem contaminada com larvas de helmintos provenientes de ovos eliminados pelos animais adultos. Além disso, os animais eram muito jovens neste período (média de 61 dias de idade), não sendo capazes de montar uma resposta imune rápida e completa em uma primeira infecção (NARI e CARDOZO, 1987, p.21; McCLURE e EMMERY, 1994, p.216). Com os tratamentos anti-helmínticos efetuado em setembro e outubro, os valores médios de opg permaneceram baixos até o início de novembro.

Novo aumento de opg foi detectado na primavera, atingindo a média  $2.256,00 \pm 3.575,27$  opg (ANEXO III). Este pico pode ser atribuído ao aumento da temperatura ambiente, que gera um melhor desenvolvimento das larvas na pastagem, aumentando a carga parasitária ingerida por animal (NARI e CARDOZO, 1987, p.14). Apesar da média de opg ter sido mais baixa neste período, os animais mais jovens do lote chegaram a apresentar valores de opg muito elevados, da ordem de 13.900 opg. Este valor é indicativo de um alto grau de parasitismo, o que provocou anemia intensa em alguns cordeiros. Após a dosificação anti-helmíntica os valores de opg caíram mas voltaram a subir gradativamente até a ocorrência de dois novos picos de parasitismo: em fevereiro e março. Estes picos também podem ser atribuídos às condições climáticas e à contaminação das pastagens.

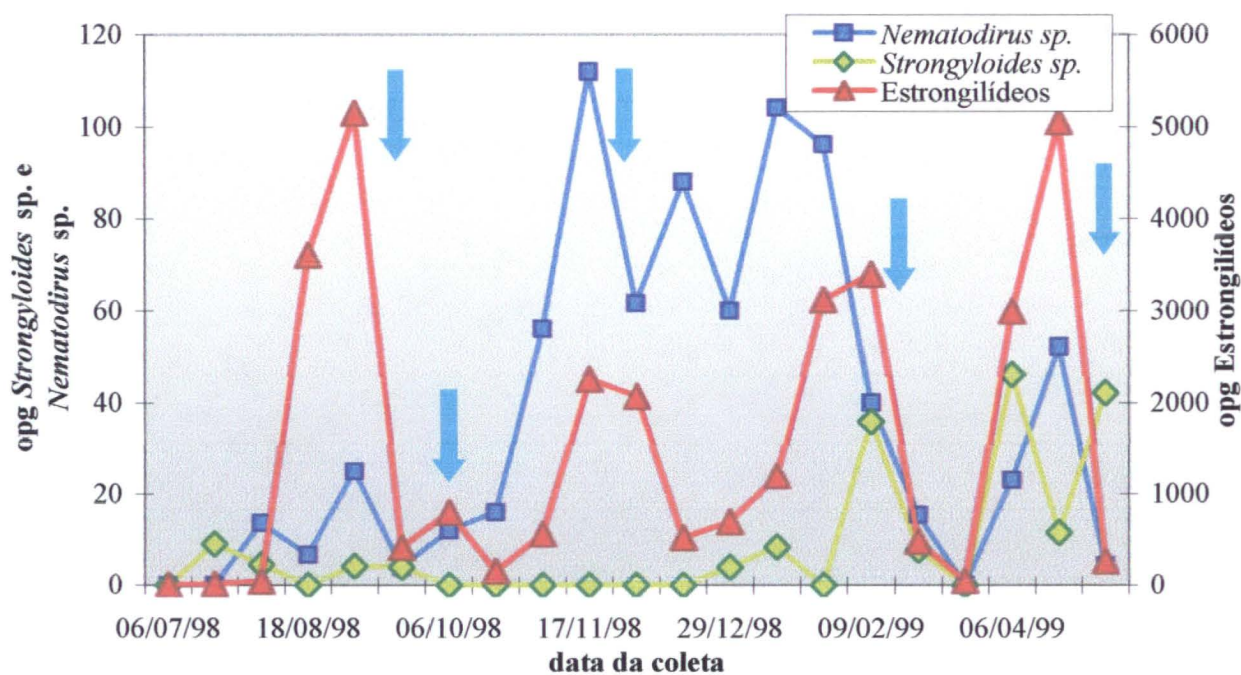


GRÁFICO 24 – MÉDIA DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) NOS CORDEIROS ACOMPANHADOS DE JULHO DE 1998 A JUNHO DE 1999



NOTA: as setas indicam as dosificações anti-helmínticas realizadas durante período de estudo parasitológico

GRÁFICO 25 – MÉDIA DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG), POR TIPO DE OVO, NOS CORDEIROS ACOMPANHADOS DE JULHO DE 1998 A JUNHO DE 1999



NOTA: as setas indicam as dosificações anti-helmínticas realizadas durante o período de estudo parasitológico

Ao analisar a distribuição do opg em relação a cada tipo de ovo de helminto encontrado (GRÁFICO 25), é possível observar que os ovos de strongilídeos foram predominantes durante todo o acompanhamento. A eliminação de ovos de *Nematodirus* sp. permaneceu em níveis baixos até o final de outubro, quando houve um súbito aumento e se manteve alta até o final de janeiro, caindo abruptamente. O rápido aumento pode ser explicado pelo aumento da temperatura que ocorre nesta época do ano (SANTIAGO, BEVENGA e COSTA, 1976, p. 2-3). O rápido declínio pode estar relacionado ao fenômeno de auto-cura, uma vez que mesmo cordeiros jovens são capazes de estabelecer uma rápida resposta imune celular e humoral aos parasitos deste gênero (WINTER *et al.*, 1997, p. 189-193; ISRAF *et al.*, 1997, p.39-52).

O opg de *Strongyloides papillosus* se manteve residual durante o período de estudo, com pequenos picos precedendo os períodos de alta eliminação de ovos de strongilídeos (exceto em novembro). Pôde se observar uma maior eliminação de ovos deste parasito no final de verão e outono. Estes dados são semelhantes aos obtidos por SANTIAGO, BEVENGA e COSTA (1976, p. 2-4).

Durante o acompanhamento, houve um aumento gradativo no número de animais positivos para *Moniezia* sp. de setembro a dezembro. A partir de então, este número começou a declinar (TABELA 9). Os animais começaram a apresentar exames positivos para *Eimeria* spp. em julho e a percentagem de animais contaminados continuou em ascensão até o desmame. Ao analisar os valores individuais por animal, pôde se observar uma eliminação de oocistos progressiva neste período, diminuindo gradativamente depois do desmame. Posteriormente, puderam ser observadas oscilações na percentagem de animais positivos por coleta, mas a eliminação de oocistos *per capita* permaneceu baixa. Os resultados obtidos para *Moniezia* sp. e *Eimeria* spp. confirmam os achados de SOTOMAIOR (1997, p.38-39), que relata a alta prevalência destes parasitos em animais jovens.

TABELA 9 – PERCENTAGEM DE CORDEIROS POSITIVOS PARA OVOS DE *MONIEZIA* SP. E OOCISTOS DE *EIMERIA* SPP. NO MÉTODO DE WILLIS (1927, P. 375-376), POR DATA DE COLETA

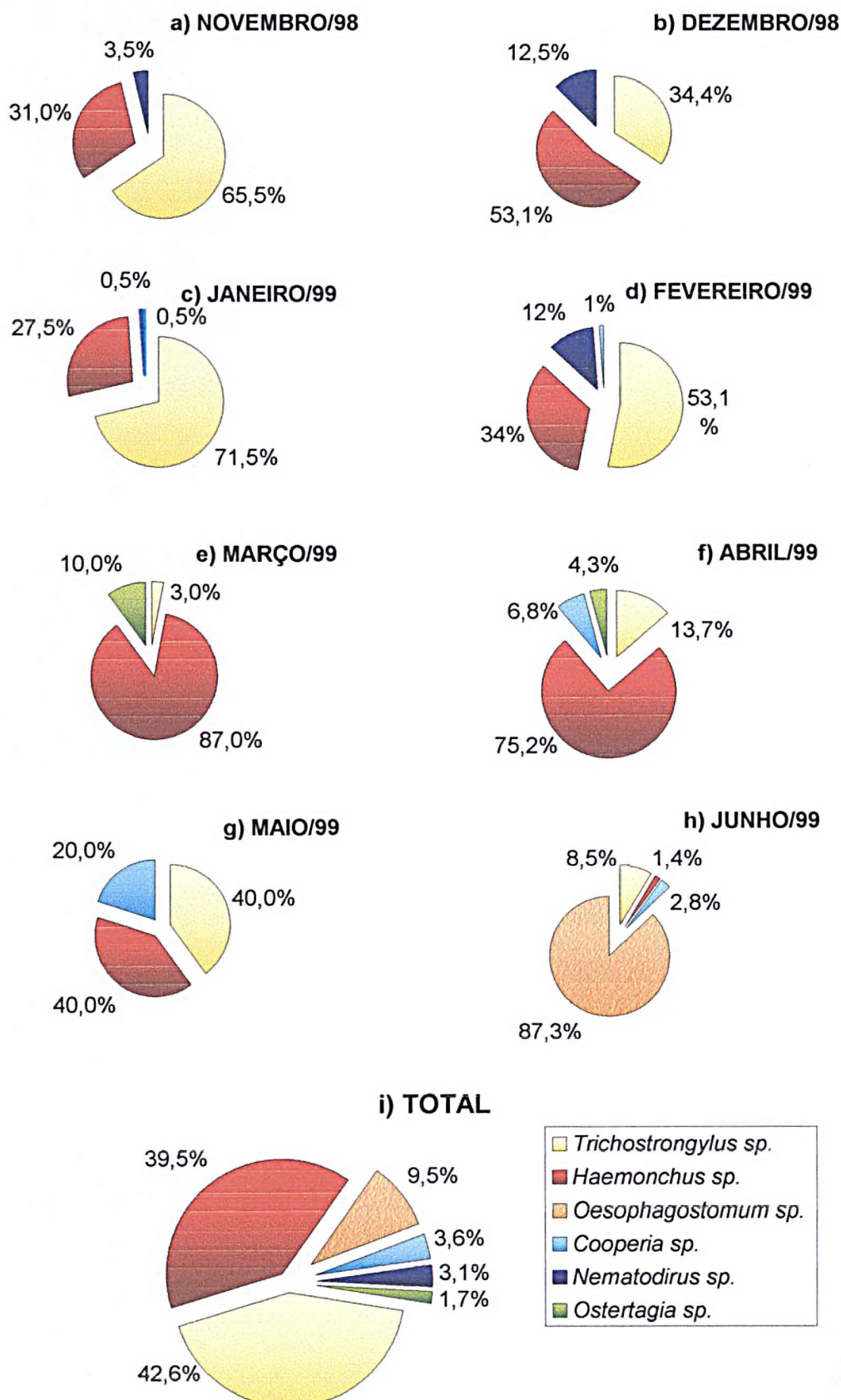
DATA	ANIMAIS POSITIVOS PARA <i>MONIEZIA</i> SP.		ANIMAIS POSITIVOS PARA <i>EIMERIA</i> SPP.	
	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
06/07/98 <sup>(1)</sup>	0	0,0	0	0,0
21/07/98	0	0,0	5	20,0
05/08/98 <sup>(1)</sup>	0	0,0	3	23,1
18/08/98 <sup>(1)</sup>	0	0,0	14	93,3
02/09/98 <sup>(1)</sup>	10	41,8	23	92,0
16/09/98 <sup>(1)</sup>	8	42,1	19	100,0
06/10/98	13	52,0	25	100,0
23/10/98	22	88,0	8	32,0
03/11/98	22	88,0	15	60,0
17/11/98	24	96,0	19	76,0
01/12/98	23	92,0	12	48,0
15/12/98	22	88,0	19	76,0
29/12/98	25	100,0	24	96,0
12/01/99	23	92,0	10	40,0
26/01/99	24	96,0	4	16,0
09/02/99	14	56,0	16	64,0
23/02/99	7	28,0	1	4,0
09/03/99	9	36,0	0	0,0
06/04/99	9	36,0	10	40,0
04/05/99	6	24,0	4	16,0
01/06/99	0	0,0	3	12,0
<b>MÉDIA</b>	<b>12,4</b>	<b>50,3</b>	<b>11,1</b>	<b>48,0</b>

NOTA: n = 25 animais acompanhados;

(1) coleta por amostragem do lote

As culturas de larvas (GRÁFICO 26.i) indicaram predominância dos gêneros *Trichostrongylus* sp. (com 42,6% do total de larvas) e *Haemonchus* sp. (39,5% do total). O primeiro foi mais prevalente até o mês de fevereiro, provavelmente como reflexo da contaminação da pastagem pelos animais adultos durante a lactação. Com a proximidade do outono e a presença de maiores índices pluviométricos, *Haemonchus* passa a ser o gênero mais prevalente (GRÁFICO 26.a-h). Os gêneros *Oesophagostomum* sp., *Cooperia* sp., *Nematodirus* sp. e *Ostertagia* sp. também foram observados. *Oesophagostomum* sp. foi encontrado em grande quantidade apenas no mês de junho, representado 87,3% das larvas recuperadas nesse mês (GRÁFICO 26.h).

GRÁFICO 26 – PREVALÊNCIA DE GÊNEROS DE HELMINTOS ENCONTRADOS NAS CULTURAS DE FEZES DOS CORDEIROS, NOS MESES DE NOVEMBRO (a) E DEZEMBRO DE 1998(b), JANEIRO(c), FEVEREIRO (d), MARÇO (e), ABRIL (f) MAIO (g) E JUNHO DE 1999 (h), BEM COMO NA PERCENTAGEM DO TOTAL DE LARVAS RECUPERADAS (i).



As larvas de *Nematodirus* sp. foram assinaladas no período de dezembro a fevereiro, o que coincidiu com o pico de eliminação de ovos deste parasito. Também foram encontradas larvas de *Stongyloides papillosus* nos meses de janeiro, março, abril e maio.

A presença dos gêneros *Trichostrongylus* sp., *Haemonchus* sp., *Nematodirus* sp., *Ostertagia* sp. e *Cooperia* sp. nas proporções encontradas nas culturas de larvas são semelhantes às encontradas por MORAES *et al.* (1998, p.427) na Região de Ponta Grossa-PR.

## 5.8 ACOMPANHAMENTO IMUNOLÓGICO DOS CORDEIROS

### 5.8.1 Contagem de eosinófilos

Do desmame até a terceira desverminação (coleta 5) a contagem média de eosinófilos se manteve praticamente constante, oscilando entre 52,62 e 85,87 eosinófilos por mm<sup>3</sup> (GRÁFICO 27; TABELA 10). A partir da sexta coleta (15 de dezembro) a contagem aumenta abruptamente, chegando a 180,37±241,06 eosinófilos/mm<sup>3</sup> 28 dias após. Depois, foi observado uma rápida queda, seguida de mais dois picos na contagem de eosinófilos: um no dia 09 de março (coleta 12), com média de 186,87±137,06 eosinófilos/mm<sup>3</sup>, e outro no dia 04 de maio (coleta 14), com média de 224,37 ± 181,55 eosinófilos/mm<sup>3</sup>. Em geral, alta contagem de eosinófilos ocorreu em períodos de baixo opg. Quando houveram os picos de opg, o número de eosinófilos periféricos caiu rapidamente, mas apresentou recuperação na coleta subsequente. O próprio pico ocorrido na 14.<sup>a</sup> coleta é exemplo desta recuperação.



GRÁFICO 27 – MÉDIA DE EOSINÓFILOS POR MILÍMETRO CÚBICO DE SANGUE E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DOS CORDEIROS, DURANTE O PERÍODO DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999

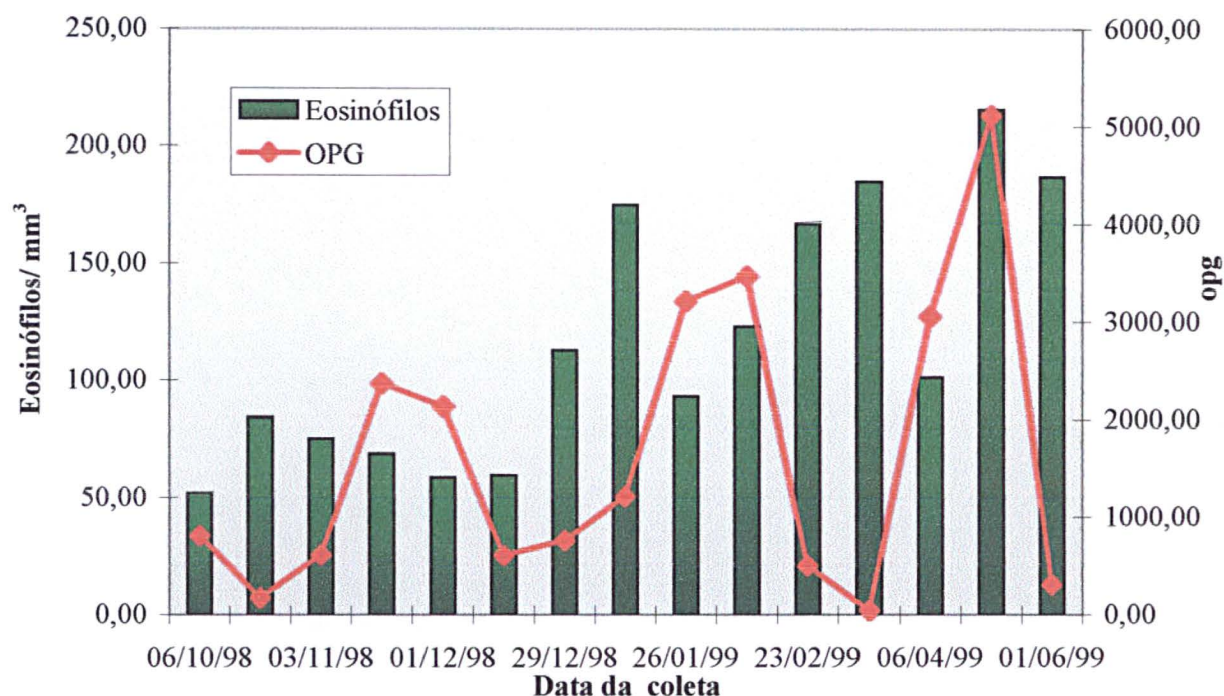


TABELA 10 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE EOSINÓFILOS CIRCULANTES DOS CORDEIROS, REALIZADAS DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999

COLETA	DATA	MÉDIA EOSINO <sup>(1)</sup>	DESVIO EOSINO <sup>(1)</sup>	MÉDIA LOG (EOSINO) <sup>(2)</sup>	DESVIO LOG (EOSINO)
1	06/10/98	52,622	33,629	1,644 a	1,638
2	23/10/98	85,872	63,604	1,825 abc	0,309
3	03/11/98	77,623	45,542	1,817 ab	0,263
4	17/11/98	68,623	69,089	1,687 a	0,380
5	01/12/98	59,873	58,871	1,635 a	0,347
6	15/12/98	59,628	60,596	1,662 a	0,293
7	29/12/98	116,127	99,557	1,920 bc	0,373
8	12/01/99	180,373	241,065	2,031 cde	0,437
9	26/01/99	97,998	91,580	1,809 ab	0,426
10	09/02/99	126,498	139,190	1,951 bcd	0,356
11	23/02/99	170,997	120,373	2,131 def	0,308
12	09/03/99	186,873	137,065	2,177 ef	0,286
13	06/04/99	105,497	78,474	1,925 bc	0,295
14	04/05/99	224,373	181,555	2,248 f	0,300
15	01/06/99	199,998	216,974	2,157 ef	0,356

(1) células por mm<sup>3</sup>

(2) agrupadas pelo teste de Duncan, p <0,05

### 5.8.2 IgG anti-*Haemonchus contortus*

A média de densidade óptica para pesquisa de IgG específica mostrou um aumento progressivo até a coleta do dia 12/01/99 (coleta 8), quando a médias das densidades ópticas foi de  $0,388 \pm 0,118$  (GRÁFICO 28). A partir de então, as médias desta característica permaneceram constantes até o fim do acompanhamento do rebanho (TABELA 11).

### 5.8.3 IgE anti-*Haemonchus contortus*

A média de densidade óptica para pesquisa de IgE específica anti-H.c. mostrou um aumento progressivo até a estabilização. Contudo, este aumento foi mais lento que o observado para IgG (GRÁFICO 29). As três primeiras coletas apresentaram uma média mais baixa de nível de anticorpos, as coletas de 8 a 13, valor intermediário, e as coletas de 14 e 15, valores mais elevados (TABELA 12).

### 5.8.4 IgE total

A média da IgE total dos cordeiros durante o período acompanhado mostrou uma curva ascendente, de 06/10 a 01/12/98 (coletas 1 a 5). (GRÁFICO 30; TABELA 13) A partir de então, a média desta variável passou a apresentar valores constantes. O aumento observado durante as primeiras coletas foi mais rápido que o obtido para as outras imunoglobulinas, resultando na estabilização da média de IgE total a partir do segundo pico de eliminação de opg (coletas 4 e 5).

GRÁFICO 28 – MÉDIA DE IgG ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DOS CORDEIROS, DURANTE O PERÍODO DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999

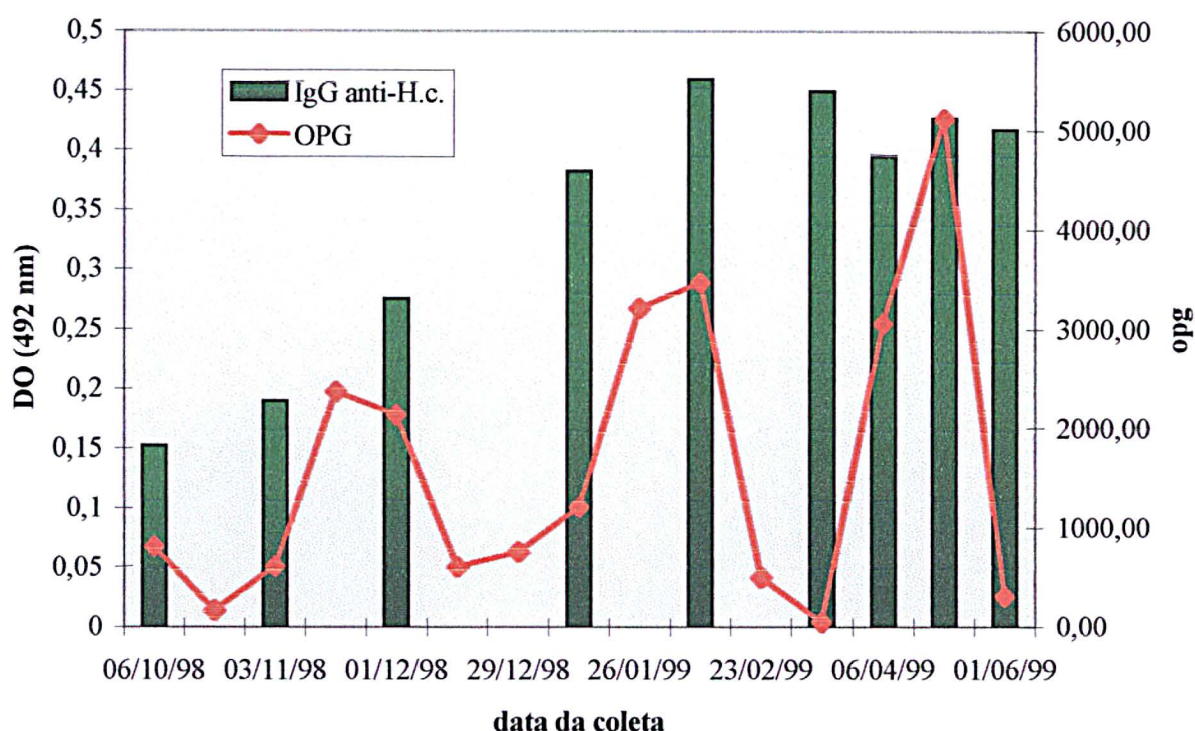


TABELA 11 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE DO PARA IgG ANTI- *HAEMONCHUS* DOS CORDEIROS, REALIZADAS DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999

COLETA	DATA	MÉDIA IGG <sup>(1)</sup>	DESVIO IGG <sup>(1)</sup>	MÉDIA LOG (IGG) <sup>(2)</sup>	DESVIO LOG (IGG)
1	06/10/98	0,149	0,076	-0,890 a	0,260
3	03/11/98	0,190	0,078	-0,755 a	0,173
5	01/12/98	0,291	0,105	-0,564 b	0,162
8	12/01/99	0,388	0,118	-0,431 c	0,142
10	09/02/99	0,466	0,156	-0,645 c	0,149
12	09/03/99	0,458	0,153	-0,363 c	0,149
13	06/04/99	0,395	0,095	-0,416 c	0,106
14	04/05/99	0,427	0,137	-0,392 c	0,148
15	01/06/99	0,435	0,130	-0,381 c	0,138

(1) valores em DO

(2) agrupadas pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$



GRÁFICO 29 – MÉDIA DE IgE ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DOS CORDEIROS, DURANTE O PERÍODO DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999

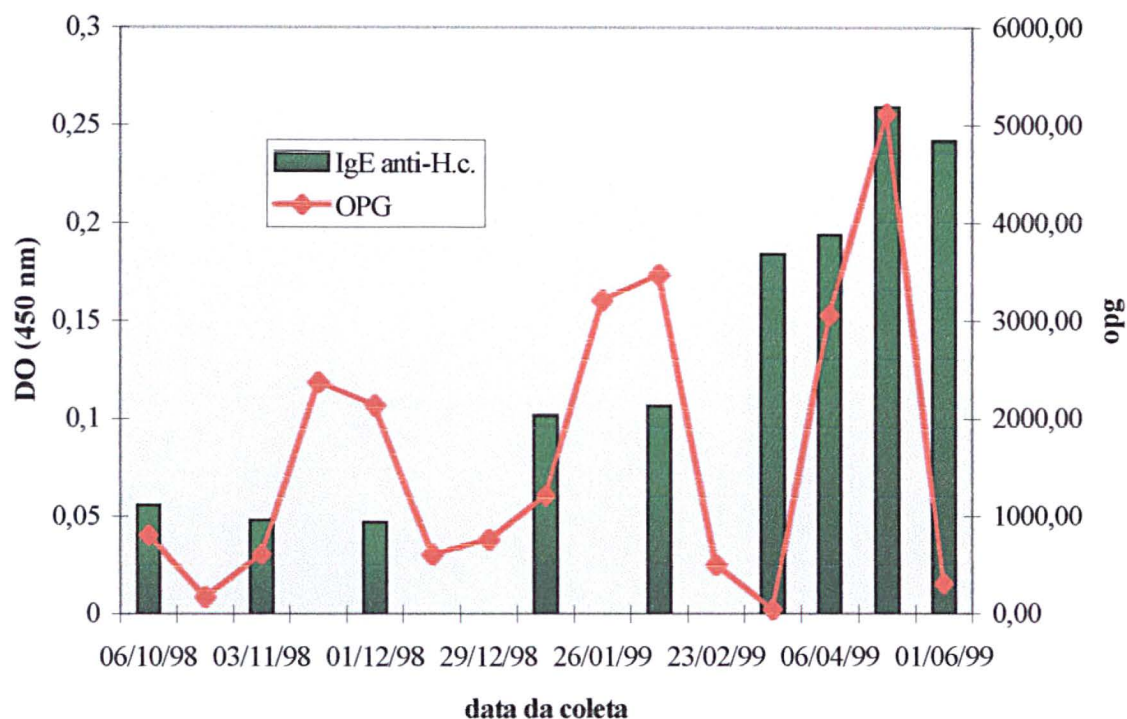


TABELA 12 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE DO PARA IgE ANTI- *HAEMONCHUS* DOS CORDEIROS, DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999

COLETA	DATA	MÉDIA IGE <sup>(1)</sup>	DESVIO IGE <sup>(1)</sup>	MÉDIA LOG (IGE) <sup>(2)</sup>	DESVIO LOG (IGE)
1	06/10/98	0,048	0,053	-1,486 a	0,352
3	03/11/98	0,046	0,038	-1,459 a	0,338
5	01/12/98	0,047	0,053	-1,523 a	0,414
8	12/01/99	0,102	0,211	-1,361 ab	0,498
10	09/02/99	0,106	0,166	-1,289 a	0,496
12	09/03/99	0,184	0,308	-1,205 ab	0,624
13	06/04/99	0,194	0,286	-1,049 ab	0,543
14	04/05/99	0,247	0,367	-0,977 b	0,560
15	01/06/99	0,242	0,313	-0,971 b	0,589

(1) valores em DO

(2) agrupadas pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$

GRÁFICO 30 – MÉDIA DE IgE SÉRICA TOTAL E DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DOS CORDEIROS, DURANTE O PERÍODO DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999

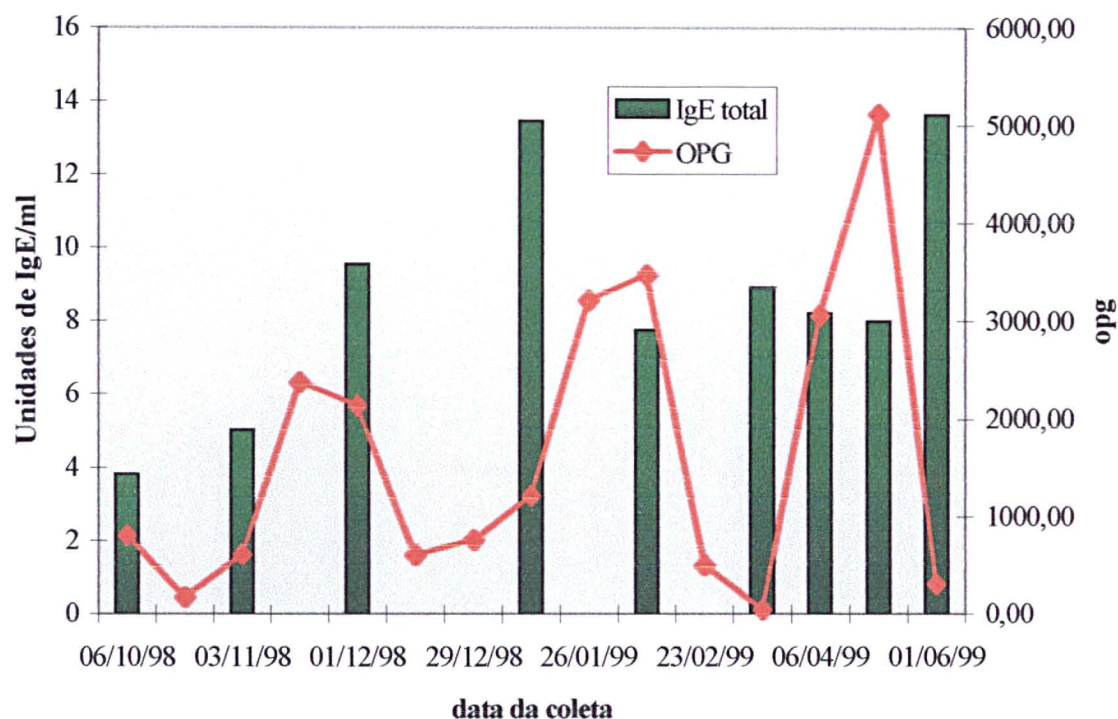


TABELA 13 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA OS VALORES BRUTOS E CORRIGIDOS DE UNIDADES DE IgE TOTAL DOS CORDEIROS, REALIZADAS DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO DE 1999

COLETA	DATA	MÉDIA T_IGE <sup>(1)</sup>	DESVIO T_IGE <sup>(1)</sup>	MÉDIA LOG (T_IGE) <sup>(2)</sup>	DESVIO LOG (T_IGE)
1	06/10/98	3,818	3,675	0,394 a	0,446
3	03/11/98	5,038	3,257	0,609 a	0,310
5	01/12/98	9,542	6,824	0,813 ab	0,459
8	12/01/99	7,080	3,588	0,800 b	0,213
10	09/02/99	7,744	4,210	0,828 b	0,241
12	09/03/99	8,919	6,723	0,842 b	0,323
13	06/04/99	8,212	5,738	0,819 b	0,306
14	04/05/99	7,988	5,642	0,782 b	0,387
15	01/06/99	8,481	5,040	0,857 b	0,254

(1) valores em unidades de IgE/ml

(2) agrupadas pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$

## 5.9 ANÁLISE DE CORRELAÇÕES

Quando os valores de marcadores parasitológicos e imunológicos obtidos para todas as coletas são correlacionados entre si, observa-se que eosinófilos, IgE total e específica tendem a ser correlacionados negativamente com o opg (TABELA 14). Todas as demais correlações foram positivas.

TABELA 14 – CORRELAÇÕES DE SPEARMAN ENTRE OPG, EOSINÓFILOS CIRCULANTES, IgE TOTAL, IgE E IgG ESPECÍFICAS DOS CORDEIROS, CONSIDERANDO TODAS AS COLETAS ENTRE OUTUBRO DE 1998 E JUNHO DE 1999

VARIÁVEL	OPG	EOSINO	IgE	T IgE	IgG
OPG	1,0000	-0,1077	-0,1743 *	-0,0022	0,1272 +
EOSINO	-0,1077	1,0000	0,2555 **	0,1668 *	0,3669 **
IgE	-0,1743 *	0,2555 **	1,0000	0,5064 **	0,4773 **
T_IgE	-0,0022	0,1668 *	0,5064 **	1,0000	0,4578 **
IgG	0,1272 +	0,3669 **	0,4773 **	0,4578 **	1,0000

+ p<0,10; \* p<0,05; \*\*p<0,01

### 5.9.1 Correlações entre eosinófilos e opg

As correlações entre eosinófilos e opg tenderam a ser negativas a maior parte do acompanhamento. Considerando-se um nível de significância de  $p<0,10$ , foram significativas as seguintes correlações:  $r_{OPG4, EOSINO1} = -0,42$ ;  $p=0,0441$ ;  $r_{EOSINO8, OPG9} = -0,35$ ;  $p=0,0877$ ;  $r_{EOSINO7, OPG7} = +0,37$ ;  $p=0,0749$ ;  $r_{EOSINO8, OPG9} = -0,35$ ;  $p=0,0877$ ; e  $r_{EOSINO10, OPG12} = -0,46$ ;  $p=0,0206$ .

### 5.9.2 Correlações entre opg e IgG específica

A análise de correlações mostrou que os níveis de IgG da primeira coleta foram correlacionados ao opg das duas coletas subsequentes ( $r_{\text{IgG1;OPG2}} = -0,46$ ;  $p = 0,0216$ ;  $r_{\text{IgG1;OPG3}} = -0,49$ ;  $p = 0,018$ ). A IgG da coleta 3 foi correlacionada significativamente com o opg das coletas 6 ( $r_{\text{IgG3;OPG6}} = -0,41$ ;  $p = 0,0445$ ) e 7 ( $r_{\text{IgG3;OPG7}} = -0,36$ ;  $p = 0,0837$ ). Foi observado também correlação entre IgG e o opg da nona coleta, relativo ao terceiro pico de parasitismo ( $r_{\text{IgG3;OPG9}} = -0,46$ ;  $p = 0,0198$ ;  $r_{\text{IgG5;OPG9}} = -0,38$ ;  $p = 0,0695$ ).

A IgG da oitava coleta, a partir da qual os níveis de IgG tendem a se estabilizar, mostrou uma correlação de  $-0,66$  ( $p = 0,0003$ ) com o opg da coleta 9. A IgG sérica de todas as coletas subsequentes também foi correlacionada ao opg deste pico de parasitismo ( $r_{\text{IgG10;OPG9}} = -0,71$ ;  $p = 0,0001$ ;  $r_{\text{IgG12;OPG9}} = -0,44$ ;  $p = 0,0262$ ;  $r_{\text{IgG13;OPG9}} = -0,59$ ;  $p = 0,037$ ). Outras correlações significativas obtidas foram:  $r_{\text{IgG14;OPG10}} = -0,46$ ;  $p = 0,0222$ ;  $r_{\text{IgG14;OPG11}} = -0,54$ ;  $p = 0,0053$  e  $r_{\text{IgG15;OPG11}} = -0,47$ ;  $p = 0,0195$ .

De uma forma geral, houve tendência a serem obtidas correlações negativas entre opg e IgG específica de todas as coletas. Uma exceção foi quando o opg da 13.<sup>a</sup> coleta foi correlacionado aos valores de IgG de todas as coletas. Neste caso, todas as correlações obtidas foram positivas, porém não significativas.

### 5.9.3 Correlações entre IgE e opg

A IgE das primeiras coletas tendeu a ser correlacionada positivamente com o opg. A  $r_{\text{OPG13;IgE1}} = 0,57$  ( $p = 0,0072$ ) e a  $r_{\text{OPG8;IgE3}} = 0,48$  ( $p = 0,0427$ ) foram as únicas consideradas significativas. A partir da quinta coleta (01/12/98), a IgE específica

passou a ter índices de correlação negativos com o opg, variando de  $-0,63$  a  $-0,39$  quando as correlações foram significativas.

#### 5.9.4 Correlações entre IgE total e opg

A IgE total da primeira coleta, embora baixa, foi correlacionada ao opg correspondente ( $r_{\text{IgE1;OPG1}} = -0,38$ ;  $p = 0,07835$ ). A análise de correlações apresentou boas correlações entre a IgE total da terceira coleta com os dados de opg das coletas subsequentes ( $r_{\text{IgE3;OPG4}} = -0,34$ ;  $p = 0,0989$ ;  $r_{\text{IgE3;OPG7}} = -0,42$ ;  $p = 0,0361$ ;  $r_{\text{IgE3;OPG9}} = -0,57$ ;  $p = 0,0027$ ;  $r_{\text{IgE3;OPG12}} = -0,41$ ;  $p = 0,04426$ ;  $r_{\text{IgE3;OPG14}} = -0,49$ ;  $p = 0,0123$ ). Das coletas que resultaram estas relações, as de número 4, 9 e 14 representam os picos de verminose.

Os valores de IgE total da quinta coleta (01/12/98), a primeira coleta após estabilização das médias desta variável, foi correlacionado aos valores de opg de coletas prévias ( $r_{\text{IgE5;OPG1}} = -0,54$ ;  $p = 0,0066$ ;  $r_{\text{IgE5;OPG2}} = -0,041$ ;  $p = 0,0477$ ;  $r_{\text{IgE5;OPG3}} = -0,46$ ;  $p = 0,0256$ ;  $r_{\text{IgE5;OPG4}} = -0,43$ ;  $p = 0,0341$ ). A IgE total da coleta 5 também foi correlacionada com o opg das coletas equivalentes ( $r_{\text{IgE5;OPG5}} = -0,40$ ;  $p = 0,0537$ ;  $r_{\text{IgE5;OPG6}} = -0,40$ ;  $p = 0,0599$ ) e dos picos subsequentes ( $r_{\text{IgE5;OPG12}} = -0,42$ ;  $p = 0,0424$ ;  $r_{\text{IgE5;OPG14}} = -0,37$ ;  $p = 0,0675$ ).

Após a quinta coleta, várias correlações significativas foram obtidas entre a IgE total e o opg. De uma forma geral, os índices foram negativos revelam associações de várias medidas de IgE com o opg de coletas correspondentes e dos picos de verminose.

### 5.9.5 Correlação entre eosinófilos e IgG específica

A IgG das coletas 8 e 10 foi correlacionada com os eosinófilos das coletas 6,7 e 8 ( $r_{IgG8;EOSINO6}=0,37$ ;  $p = 0,0664$ ;  $r_{IgG8;EOSINO7}=0,40$ ;  $p = 0,0473$ ;  $r_{IgG10;EOSINO7}=0,35$ ;  $p=0,0899$ ;  $r_{IgG8;EOSINO8} = 0,40$ ;  $p = 0,0485$ ;  $r_{EOSINO8; IgG10} =0,35$ ;  $p= 0,0890$ ). Outras correlações significativas entre essas variáveis foram:  $r_{IgG1;EOSINO5}=0,49$  ( $p = 0,0154$ );  $r_{IgG1;EOSINO12}=0,35$  ( $p = 0,0922$ ) e  $r_{EOSINO12; IgG3} = 0,40$  ( $p = 0,0494$ ). Na maior parte do acompanhamento houve tendência à correlação positiva entre estas duas variáveis.

### 5.9.6 Correlação entre eosinófilos e IgE específica

Houve maior tendência a se estabelecerem correlações positivas do que negativas entre eosinófilos e IgE específica ao longo do acompanhamento. Apenas as seguintes correlações entre eosinófilos e IgE específica foram assinaladas como significativas para  $p<0,10$ :  $r_{IgE1;EOSINO2}=0,39$  ( $p=0,0802$ );  $r_{IgE1;EOSINO12}=0,38$  ( $p=0,0904$ );  $r_{IgE3;EOSINO2} = 0,40$  ( $p = 0,0858$ );  $r_{IgE3;EOSINO7} = 0,64$  ( $p = 0,0019$ );  $r_{IgE3;EOSINO9} = 0,59$  ( $p = 0,0053$ );  $r_{IgE5;EOSINO15} = 0,44$  ( $p = 0,0442$ );  $r_{IgE14;EOSINO15} = 0,37$  ( $p = 0,0778$ ).

### 5.9.7 Correlação entre eosinófilos e IgE total

Como para a IgG e a IgE específica, os valores de IgE total foram fracamente correlacionados ao número de eosinófilos periféricos. Considerando um nível de significância de  $p<0,10$ , as únicas correlações obtidas foram:  $r_{IgE10;EOSINO14} = -0,34$  ( $p=0,0916$ );  $r_{IgE10;EOSINO14} = -0,41$  ( $p=0,0483$ );  $r_{IgE14;EOSINO14} = -0,39$  ( $p=0,0491$ ) e  $r_{IgE10;EOSINO14} = -0,40$  ( $p=0,0937$ ).

### 5.9.8 Correlação entre IgE e IgG específicas

A IgG foi correlacionada positivamente com a IgE anti-H.c. total durante todo o acompanhamento. Correlações significativas foram obtidas entre várias coletas, com valores de  $r$  variando de 0,41 e 0,82, quando as correlações foram significativas. Um maior número de correlações significativas foi obtido para as coletas 8 a 12.

### 5.9.9 Correlação entre IgE total e IgG

A IgG foi correlacionada positivamente com a IgE total entre muitas coletas, com valores de  $r$  variando de 0,42 a 0,57 para IgE total, quando o valor de  $r$  foi significativo para  $p < 0,10$ . Um maior número de correlações significativas entre essas variáveis foi obtido entre a quinta e a décima coleta.

### 5.9.10 Correlação entre os marcadores parasitológicos, imunológicos e a idade do animal

A análise de correlações entre a idade dos cordeiros e o opg mostrou-se significativa para  $p < 0,10$  no desmame ( $r_{\text{IDADE; OPG1}} = -0,35$ ;  $p = 0,0892$ ), primeiro ( $r_{\text{IDADE; OPG3}} = -0,42$ ;  $p = 0,0384$ ;  $r_{\text{IDADE; OPG4}} = -0,50$ ;  $p = 0,0106$ ) e segundo ( $r_{\text{IDADE; OPG10}} = +0,38$ ;  $p = 0,0664$ ) picos de parasitismo pós desmame.

Não foi observada correlação significativa do número de eosinófilos sanguíneos com a idade dos animais. Tanto para IgE total, quanto para IgE e IgG específicas, quase todas as correlações obtidas com a idade foram positivas. Para a IgE total, foram significativas as correlações das coletas 1 ( $r_{\text{IDADE; TIGE1}} = 0,44$ ;  $p = 0,0383$ ) e 5 ( $r_{\text{IDADE; TIGE5}} = 0,44$ ;  $p = 0,0315$ ). Para IgE específica, foram significativas as das coletas 3

( $r_{\text{IDADE;IGE3}}=0,67$ ;  $p=0,0019$ ); 5 ( $r_{\text{IDADE;IGE5}}=0,47$ ;  $p=0,0274$ ); 13 ( $r_{\text{IDADE;IGE13}}=0,50$ ;  $p=0,0407$ ) e 14 ( $r_{\text{IDADE;IGE14}}=0,40$ ;  $p=0,0476$ ). As correlações significativas entre IgG específica e idade compreenderam as três primeiras coletas ( $r_{\text{IDADE;IGG1}}=0,48$ ;  $p=0,0171$ ;  $r_{\text{IDADE;IGG3}}=0,38$ ;  $p=0,0582$  e  $r_{\text{IDADE;IGG5}}=0,58$ ;  $p=0,0031$ ).

#### 5.9.11 Correlação entre os marcadores parasitológicos, imunológicos e o peso do cordeiro ao nascer ou ao desmame

As correlações entre ovos de helmintos por grama de fezes e peso tenderam a ser positivas. Quando se levou em conta o peso dos cordeiros ao nascer, a única correlação significativa foi obtida com o opg da 11.<sup>a</sup> coleta ( $r_{\text{PN,OPG11}}=0,38$ ;  $p=0,0603$ ). Quando foi considerado o peso ao desmame, as correlações com o opg da 6.<sup>a</sup> ( $r_{\text{PD,OPG6}}=0,38$ ;  $p=0,0702$ ); 7.<sup>a</sup> ( $r_{\text{PD,OPG7}}=0,61$ ;  $p=0,0017$ ) e 11.<sup>a</sup> ( $r_{\text{PD,OPG11}}=0,36$ ;  $p=0,0793$ ) coletas foram significativas.

Entre eosinófilos periféricos e peso também houve uma forte tendência a se formarem correlações positivas. Destas, foram significativas as entre os eosinófilos das coletas 3, 14 e 15 e o peso ao nascer, com os valores de  $r_{\text{PN,EOSINO3}}=0,37$  ( $p=0,0717$ );  $r_{\text{PN,EOSINO14}}=0,36$  ( $p=0,0752$ ) e  $r_{\text{PN,EOSINO15}}=0,42$  ( $p=0,00426$ ), respectivamente; e os das coletas 2, 6 e 14 e o peso ao desmame, de  $r_{\text{PD,EOSINO2}}=0,45$  ( $p=0,0239$ );  $r_{\text{PD,EOSINO6}}=0,41$  ( $p=0,0396$ ) e  $r_{\text{PD,EOSINO14}}=0,35$  ( $p=0,0808$ ).

Para IgG específica, todas as coletas foram correlacionadas significativamente com o peso ao nascer dos cordeiros, com valores de  $r$  variando entre  $-0,34$  a  $-0,52$ . Contudo, os dados de IgG de nenhuma coleta foram correlacionados significativamente com os de peso ao desmame dos cordeiros.

Os dados de IgE específica para todas as coletas foram correlacionados negativamente com o peso ao nascer, mas apenas os das coletas 10 ( $r_{\text{PN,IGE10}}=-0,46$ ;  $p=0,0276$ ) e 12 ( $r_{\text{PN,IGE12}}=-0,50$ ;  $p=0,0264$ ) foram significativos. Como para IgG, os



dados de nenhuma coleta mostraram correlações significativas com o peso ao desmame.

Para IgE total, dados de todas as coletas (exceto as de número 1, 13 e 14) foram correlacionados com o peso ao nascer dos cordeiros, com valores de  $r$  variando de  $-0,37$  a  $-0,46$ . Todas as correlações entre IgE total e peso ao desmame foram negativas, mas somente a que considerou dados da 8.<sup>a</sup> ( $r_{PD,TIGE8} = -0,39$ ;  $p = 0,0542$ ) e da 15.<sup>a</sup> ( $r_{PD,TIGE15} = -0,35$ ;  $p = 0,0913$ ) foram significativas para  $p < 0,10$ .

#### 5.9.12 Correlação entre mães e filhos

A fim de verificar o nível de correlação do número de ovos de helmintos por grama de fezes e das variáveis imunológicas entre mães e filhos, os dados de todas as coletas dos cordeiros foram cruzados com os de suas respectivas mães por ocasião da 6.<sup>a</sup> coleta dos animais adultos, correspondente ao pico de parasitismo. Para o opg, a única correlação significativa com o opg materno foi obtida a partir dos dados da segunda coleta dos cordeiros ( $r_{OPG6M\tilde{A}E;OPG2} = 0,44$ ;  $p = 0,0529$ ). Apesar de não significativo, foi obtido um valor de correlação entre o opg materno e o da décima coleta, correspondente ao terceiro pico de verminose dos cordeiros, de  $0,32$  ( $p = 0,1817$ ). Para os eosinófilos, as coletas 6 ( $r_{EOSINO6M\tilde{A}E;EOSINO6} = 0,47$ ;  $p = 0,0346$ ), 11 ( $r_{EOSINO6M\tilde{A}E;EOSINO11} = 0,38$ ;  $p = 0,0939$ ) e 14 ( $r_{EOSINO6M\tilde{A}E;EOSINO14} = 0,43$ ;  $p = 0,0552$ ) resultaram correlações significativas com os dados maternos. Quanto à IgE, algumas correlações entre  $0,24$  e  $0,39$  foram obtidas, mas somente os dados da 13.<sup>a</sup> coleta foram correlacionados significativamente com o de IgE materna ( $r_{IGE6M\tilde{A}E;IGE13} = 0,42$ ;  $p = 0,0832$ ). Não foi obtida correlação significativa entre a IgE total dos cordeiros e a IgE específica de suas mães, nem entre a IgG específica de mães e filhos. Contudo, as correlações entre IgG foram mais constantes do que as obtidas para os outros marcadores, oscilando entre  $0,28$  e  $0,35$  da primeira à 12.<sup>a</sup> coleta.

A média de eosinófilos no lote de cordeiros revelou baixos valores no início do experimento. Apesar disto, a correlação entre eosinófilos e opg do segundo pico de parasitismo ( $r_{OPG4, EOSINO1} = -0,42$ ;  $p=0,0441$ ) pode indicar algum papel dos eosinófilos na regulação da verminose, ainda que a resposta imune não esteja completa. A correlação  $r_{IgG1, EOSINO5} = 0,49$  ( $p=0,0154$ ) pode indicar a fase inicial de uma resposta imune Th2.

O primeiro aumento na média de eosinófilos, que aconteceu nas coletas 7 e 8 (29/12/98 e 12/01/99, respectivamente), pode indicar o início de uma resposta imune protetora. Os dados para número de eosinófilos neste período foram positivamente correlacionados aos de IgG nas coletas 8 e 10, e negativamente correlacionados ao pico de opg subsequente. Outro indício desta hipótese estar correta é a correlação dos valores de eosinófilos com opg de coletas prévias até a coleta 7. Isso indica que foi necessário a presença de helmintos adultos no trato gastrointestinal para que ocorresse uma resposta eosinofílica. Após a coleta 7 os valores de eosinófilos tenderam a ser correlacionados com opg de coletas posteriores. Isso indica que, em um segundo momento, o número de eosinófilos circulantes foi capaz de regular o estabelecimento da carga parasitária.

O pico de opg observado na 9.<sup>a</sup> coleta foi acompanhado de uma queda no número de eosinófilos periféricos. É possível que os eosinófilos tenham migrado dos vasos para a mucosa gastrointestinal nesta fase do acompanhamento, a fim de agir sobre os helmintos presentes no trato digestório. A correlação negativa entre o opg desta coleta e os eosinófilos da coleta anterior ( $r_{EOSINO8, OPG9} = -0,35$ ;  $p = 0,0877$ ) corrobora esta hipótese.

Na coleta 10 (09/02/99), o número de eosinófilos periféricos volta a aumentar. Nas coletas 11 e 12, um novo pico de eosinófilos é evidente, mas os valores voltam a cair quando o opg aumenta na 13.<sup>a</sup> coleta. A manutenção das médias altas de opg por um mês proporcionou novo aumento na média de eosinófilos. Este comportamento da média de eosinófilos em relação à média de opg do lote também foi observado para os

animais adultos, o que é indicativo de um padrão de resposta imune definido. Em um primeiro momento, é possível que a IL-5 produzida em resposta à infecção parasitária seja responsável pela quimiotaxia dos eosinófilos para a mucosa gastrointestinal, levando à diminuição do *pool* circulante desta célula. Como a IL-5 também estimula a síntese de eosinófilos na medula óssea (TIZARD, 1998, p.365), é compreensível a eosinofilia no segundo tempo de uma infecção.

A média de IgG específica mostrou um aumento progressivo até a coleta do dia 12/01/99 (coleta 8), permanecendo constante a partir de então. A análise de correlações mostrou uma tendência dos níveis de IgG das primeiras coletas a serem correlacionados ao opg das coletas subsequentes. Isso pode mostrar um esboço de resposta imune, capaz de manter o opg baixo pelo período de um mês. É possível que esta resposta, mesmo incipiente, tenha sido capaz de retardar o segundo pico de parasitismo (coletas 4 e 5) nos animais mais velhos. Isso explicaria o fato do segundo pico de parasitismo ter sido mais intenso nos cordeiros mais jovens, que tiveram menor oportunidade de se infectar com L<sub>3</sub> de helmintos durante o aleitamento.

A IgG da oitava coleta, a partir da qual a média da variável tende a se estabilizar, mostrou uma correlação de  $-0,66$  ( $p = 0,0003$ ) com o opg da coleta 9. A IgG sérica de todas as coletas subsequentes também foi correlacionada ao opg deste pico de parasitismo. A estabilização da média das DO para IgG específica bem como suas correlações com o opg a partir da oitava coleta são indicativos da definição do padrão de resposta imune à verminose.

A média de IgE específica anti-H.c. mostrou um aumento progressivo, porém mais lento que o da IgG. As primeiras coletas apresentaram um nível mais baixo de anticorpos, as coletas de 8 a 13, valor intermediário, e as de 12 a 15, valores elevados. A IgE das duas primeiras coletas tendeu a ser correlacionada positivamente com o opg. Essas correlações indicam associação com valores de opg altos ou em ascensão, e não com coletas após dosificação anti-helmíntica. É possível que as três primeiras medidas de IgE específica não sejam indicativas de uma resposta imune efetiva. Caso o fosse,

seria esperada uma correlação negativa entre essas variáveis. A partir da quinta coleta (01/12/98), a IgE específica passou a ter índices de correlação com o opg dentro do esperado, variando de  $-0,63$  a  $-0,39$  quando as correlações foram significativas.

A média da IgE total dos cordeiros durante o período acompanhado mostrou uma curva ascendente, de 06/10 a 01/12/98 (coletas 1 a 5). A partir de então, passou a apresentar valores constantes. O aumento observado durante as primeiras coletas foi mais rápido que o obtido para as outras imunoglobulinas, resultando na estabilização da média de IgE total a partir do segundo pico de eliminação de opg (coletas 4 e 5).

Os valores de IgE total da quinta coleta (01/12/98), primeira coleta após estabilização das médias desta variável, foi correlacionado aos valores de opg de coletas anteriores. Isso pode ser indicativo da necessidade de estímulo parasitário prévio, estimado pelo opg das coletas anteriores, para sensibilização do sistema imune e formação de células B de memória. A IgE total da coleta 5 também foi correlacionada negativamente ao opg da mesma coleta e dos picos subsequentes. Esses resultados indicam uma definição no padrão de resposta de IgE total dos cordeiros ao estímulo parasitário a partir da quinta coleta. Portanto, é possível que a esta coleta represente o ponto a partir do qual a resposta de IgE total contra os parasitos tenda a se estabelecer.

SHAW *et al.* (1998, p.297-298) observaram picos equivalentes de IgE total após dois desafios subsequentes em cordeiros previamente infectados com *T.colubriformis*. Quando a IgE específica foi mensurada, foi verificado um aumento progressivo dos níveis séricos em cada desafio. Dados semelhantes foram assinalados por KOOYMANN *et al.* (1997, p.403) comparando a infecção primária e um desafio com larvas de *H. contortus* por cinco semanas. É possível que os níveis séricos de IgE total tendam a se estabelecer antes que os de IgE específica no decorrer do desenvolvimento da resposta imune. O surgimento de uma resposta de IgE total mesmo após infecções primárias pode ser decorrente do reconhecimento a vários antígenos, nem sempre relacionados à imunidade protetora. KOOYMANN *et al.* (1997,

p.405) sugerem que o surgimento precoce de altos níveis de IgE total consista em um mecanismo de evasão do parasito à resposta imune do hospedeiro (item 3.5).

O estudo comparativo das médias das variáveis imunológicas dos cordeiros mostrou que baixos níveis sanguíneos de cada uma era detectado inicialmente. Com o passar do tempo, se estabeleceu um comportamento semelhante ao observado nas ovelhas. Para os eosinófilos, este comportamento seria a elevação do número de células por ml de sangue com queda no início dos picos de parasitismo. Isto foi observado a partir da sétima e oitava coleta. Para os anticorpos, o comportamento esperado seria a manutenção de níveis séricos praticamente constantes. Isto ocorreu a partir da quinta coleta para IgE total e da oitava coleta para IgG.

Além das diferenças assinaladas na análise das médias do lote, houve um grande número de correlações entre todos os marcadores por volta da sétima e oitava coleta. A partir destas coletas, não foi detectada nenhuma correlação entre idade e eosinófilos, IgE total ou IgG específica. As correlações entre caracteres imunológicos tenderam a ser positivas a maior parte do acompanhamento, o que indica sua inter-relação por meio da resposta imune Th2.

Estas evidências indicam que o padrão de resposta imune dos cordeiros à verminose se defina em algum momento entre a sétima e a oitava coleta. Como os animais estavam com média de idade de  $193,85 \pm 16,5$  dias por ocasião da oitava coleta, esta hipótese é viável. Segundo NARI e CARDOZO (1987, p.21) e McCLURE e EMMERY (1994, p.216), surgimento da resposta imune dos cordeiros contra os helmintos gastrintestinais ocorreria por volta dos seis meses de idade. Além disso, os animais já haviam passado por uma infecção primária (pré-desmame) e uma secundária (pico de parasitismo da primavera), o que possibilitaria a formação de células de memória imunológica. Outra evidência do surgimento da resposta imune dos cordeiros nesta fase do acompanhamento é a redução brusca na eliminação de ovos de *Nematodirus* entre as coletas 9 e 10, antes da dosificação anti-helmíntica realizada no dia 02 de

fevereiro. Este rápido declínio no opg pode estar relacionado ao fenômeno de auto-cura (item 3.3.d).

Contudo, há alguns eventos que indicam que a resposta imune detectada nos cordeiros por volta da oitava coleta não seja completa. O primeiro deles foi a correlação positiva entre o opg do terceiro pico de parasitismo (coleta 10) e a idade. Partindo-se do pressuposto de uma resposta imune completa a partir dos seis meses e meio de idade, não seria mais esperado uma relação entre idade e opg. O segundo evento é o fato da IgE específica, o caráter imunológico cujas correlações com o marcador parasitológico foram mais significativas, não apresentar estabilização nos valores séricos até o final do experimento. As correlações entre IgE específica e idade continuaram positivas até o final do acompanhamento, indicando que a resposta imune ainda não era completa. Mesmo o surgimento da resposta imune protetora contra *Nematodirus*, observada a partir da décima coleta, é esperado antes do surgimento da resposta contra os demais helmintos gastrintestinais (WINTER *et al.*, 1997, p. 189-193; ISRAF *et al.*, 1997, p.39-52). O quarto e último evento é que a média dos valores individuais para todas as variáveis imunológicas estudadas foi inferior à média dos animais adultos, apesar de um padrão de resposta semelhante entre as categorias ter sido observado após os cordeiros completarem seis meses e meio de idade.

KAMBARA e McFARLANE (1996, p.131-135) observaram um decréscimo no número de linfócitos CD4<sup>+</sup> e um aumento no número de células T19<sup>+</sup> no sangue periférico e linfa do ducto linfático intestinal de cordeiros de dois a seis meses e meio de idade, ao longo de 12 semanas de desafio com larvas de *T. colubriformis*. Para animais mais velhos, foi observado um aumento de células CD8<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup> e, principalmente, CD4<sup>+</sup>. Esses achados indicam que linfócitos T19<sup>+</sup> devam apresentar um papel importante na resposta imune à verminose em cordeiros jovens, da mesma forma que as células CD4<sup>+</sup> para animais mais velhos.

É bem possível que os cordeiros já tenham capacidade de regular parcialmente a carga parasitária por meio de sua resposta imune a partir dos seis meses e meio de

idade, mas que repetidos desafios sejam necessárias para desenvolver a imunidade protetora. Mesmo animais adultos não são capazes de elaborar uma boa resposta imune contra *H. contortus* (SANTIAGO *et al.*, 1976 *apud* ECHEVARRIA, 1996b, p.162) e dependem de infecções constantes para manutenção da resposta efetiva SUTHERLAND *et al.* (1999, p. 261-271).

As correlações com o peso mostraram índices positivos para o opg e o número de eosinófilos periféricos, bem como índices negativos para IgE total, IgE e IgG específicas. O esperado seria que cordeiros nascidos ou desmamados leves fossem mais fracos que os demais e apresentassem maior opg (correlação positiva) e menor nível de anticorpos e eosinófilos (correlação negativa). A inversão na tendência das correlações observada neste estudo pode ser atribuída à diversidade do grau de sangue *Suffolk* dos cordeiros. A raça *Suffolk* é uma raça de ovinos de grande porte e especializada na produção de carne. Vários estudos consideraram esta raça mais susceptível à verminose do que outras (BAHIRATHAN *et al.*, 1996, p.259-268; MILLER *et al.*, 1998, p. 55-74; MORAES *et al.*, 2001, p.68). Os cordeiros de maior grau de sangue *Suffolk* tendem a ser os mais pesados do lote e, possivelmente, mais susceptíveis à verminose. Isto explicaria a inversão das tendência à positividade ou negatividade das correlações obtidas neste trabalho.

As correlações entre mães e filhos mostraram poucos valores significativos, provavelmente devido à baixa amostragem. Também deve ser considerada a probabilidade dos cordeiros ainda não terem desenvolvido sua total capacidade genética de resposta imune à verminose durante o período do acompanhamento.

Como as correlações obtidas entre mães e filhos foram de nível baixo a intermediário, conclui-se que a maior causa das variações nos caracteres estudados é o meio ambiente temporário.

Na literatura, são citados valores de herdabilidade de 0,20 a 0,42 para o opg (DOUCH *et al.*, 1996, p.905); zero a 0,19 para o número de eosinófilos circulantes (WOOLASTON *et al.*, 1998, p.124-125); 0,18 a 0,43 para a IgG específica (DOUCH *et*

*al.*,1996, p.905-906) e 0,36 a 0,52 para a IgE específica (SHAW *et al.*, 1999, p.30). Como cada indivíduo recebe apenas metade da carga genética materna, seria esperado uma correlação mãe e filho em torno de 0,10 a 0,20 para opg; 0,09 a 0,21 para IgG e 0,18 a 0,25 para IgE específica. Contudo, algumas das correlações obtidas superaram estes valores, indicando também a influência do meio ambiente permanente comum para mães e filhos.

## 5.10 SELEÇÃO DOS CORDEIROS

### 5.10.1 Repetibilidade dos marcadores para seleção de cordeiros resistentes ao parasitismo

Inicialmente, foi realizada uma medida de repetibilidade dos dados de todas as coletas dos cordeiros (TABELA 15). Dos marcadores imunológicos, o logaritmo do número de eosinófilos sanguíneos foi o que obteve o índice mais elevado, com  $R_{\text{EOSINO}}=0,31\pm0,09$ . O de índice mais baixo foi o logaritmo das DO para IgG específica, com  $R_{\text{IGG}}=0,07\pm0,05$ .

Visando avaliar a repetibilidade de cada marcador imunológico após a definição do seu padrão de resposta à verminose, foram elaboradas três hipóteses de agrupamento. A primeira, considerou as medidas de todas as coletas após a quinta, a partir da qual os níveis de IgE total se tornam constantes. O valor obtido para esta variável nesta hipótese foi de  $R_{\text{IGE}} = 0,26\pm0,09$ . A segunda hipótese considerou os dados de todas as coletas a partir da oitava, quando os valores de eosinófilos e IgG específica passam a apresentar um comportamento semelhante ao dos animais adultos. Para os eosinófilos, o valor de repetibilidade foi de  $0,42\pm0,12$ . Para IgG específica, foi de  $0,69\pm0,13$ . A última hipótese considerou os dados de todas as coletas a partir da 12.<sup>a</sup>, que coincidiram com os valores mais altos de IgE específica. A repetibilidade



para esta variável nesta hipótese foi de  $0,27 \pm 0,13$ . Para todas as hipóteses, a repetibilidade dos valores de opg se mostrou nula.

TABELA 15 – REPETIBILIDADES (R) E DESVIOS PADRÕES DA REPETIBILIDADE ( $S_{(R)}$ ) OBTIDOS PARA AS VARIÁVEIS UTILIZADAS COMO MARCADORES PARA A SELEÇÃO DE ANIMAIS RESISTENTES ÀS PARASITOSES, CONSIDERANDO k COLETAS DE DADOS DOS CORDEIROS

AGRUPAMENTO	VARIÁVEL	k	R	$S_{(R)}$
Todas as coletas	Log(OPG+1)	9	-0,0001	0,0340
	Log(EOSINO)	9	0,3113	0,0985
	Log (IgE)	9	0,2121	0,0814
	Log(tIgE)	9	0,2611	0,0903
	Log(IgG)	9	0,0785	0,0532
A partir da quinta coleta (01/12/98)	Log(OPG+1)	7	-0,0282	0,0375
	Log(EOSINO)	7	0,3499	0,1113
	Log (IgE)	7	0,2284	0,0928
	Log(tIgE)	7	0,2666	0,0992
	Log(IgG)	7	0,1033	0,0683
A partir da oitava coleta (12/01/99)	Log(OPG+1)	6	-0,0404	0,0429
	Log(EOSINO)	6	0,4293	0,1253
	Log (IgE)	6	0,2278	0,0991
	Log(tIgE)	6	0,2730	0,1063
	Log(IgG)	6	0,6949	0,1303
A partir da décima coleta (09/02/99)	Log(OPG+1)	5	-0,0777	0,0462
	Log(EOSINO)	5	0,3707	0,1271
	Log (IgE)	5	0,2449	0,1110
	Log(tIgE)	5	0,5225	0,1378
	Log(IgG)	5	0,7340	0,1310

Os valores de repetibilidade obtidos para os cordeiros foram inferiores aos obtidos para as ovelhas, exceto para IgG. Isto indica que os animais jovens tiveram maior variabilidade de resposta entre as coletas que os adultos, mesmo após a estabilização da média do lote para cada variável.

A IgE total apresentou menor repetibilidade que a IgE específica, exceto quando considerados os valores das coletas 10 a 15, quando foi alcançado o índice de

0,52  $\pm$  0,14. Embora relativamente alto, este índice foi inferior ao obtido por SHAW *et al.* (1999, p.29), com  $R = 0,72 \pm 0,03$ .

Da mesma forma que para as ovelhas, seria esperado uma baixa repetibilidade do opg, tendo em vista que os valores de opg obtidos fora dos períodos críticos não são preditivos dos obtidos em picos de verminose. Contudo, os valores nulos de repetibilidade indicam uma grande variação individual, provavelmente mesmo quando se considera apenas os picos de verminose. Desta forma, seria necessário avaliar mais de um pico de parasitismo para se identificar cordeiros resistentes ou susceptíveis com maior segurança.

#### 5.10.2 Classificação dos cordeiros em resistentes e susceptíveis ao parasitismo com base no marcador parasitológico (número de ovos de helmintos por grama de fezes)

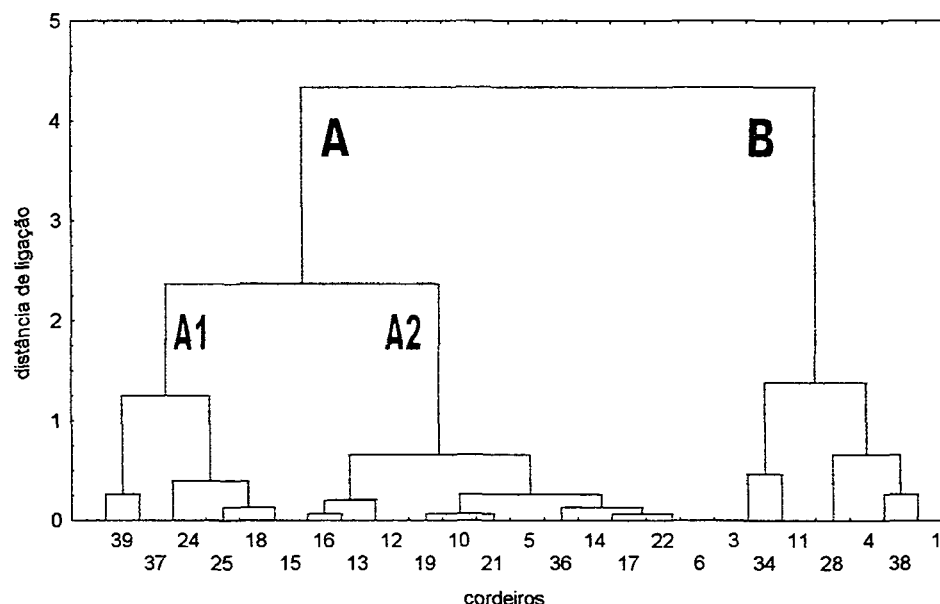
Para classificação dos cordeiros em resistentes e susceptíveis foram elaboradas três hipóteses de agrupamento:

- 1- dados de opg da quinta coleta, relativa ao segundo pico de parasitismo, quando os cordeiros apresentavam média de cinco meses de idade;
- 2- dados de opg da décima coleta, relativa ao terceiro pico de parasitismo, quando os cordeiros apresentavam média de sete meses e meio de idade;
- 3- dados de opg da 14.<sup>a</sup> coleta, relativa ao quarto pico de parasitismo, quando os cordeiros apresentavam média de idade de dez meses

O diagrama construído com os dados da primeira hipótese mostra a formação de dois grupos de animais ao nível da distância euclidiana de 4,33 (GRÁFICO 31). O grupo A foi subdividido em dois sub-grupos: A1, que compreendeu seis animais com opg elevado, correspondendo ao grupo susceptível, e A2, com 13 animais de baixo

opg, correspondendo ao grupo resistente. O grupo B reuniu seis animais com opg muito elevado. Portanto, este grupo foi considerado altamente susceptível.

**GRÁFICO 31 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES DA QUINTA COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADA EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998**

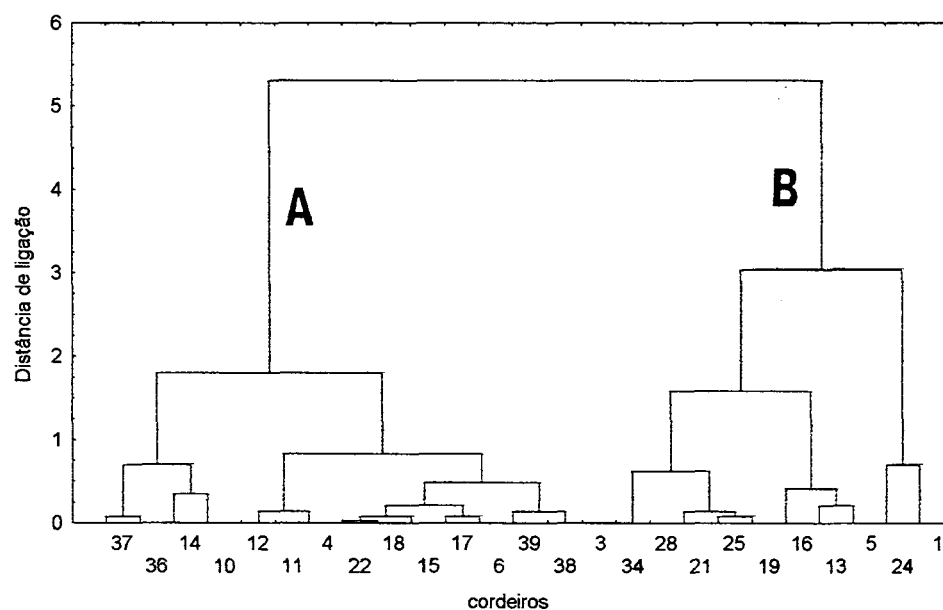


NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

A segunda hipótese também foi capaz de diferenciar dois grupos de animais, separando-os ao nível 5,31 de distância (GRÁFICO 32). O grupo A reuniu 15 animais de baixo opg (resistentes) e o B, dez animais de alto opg (susceptíveis).

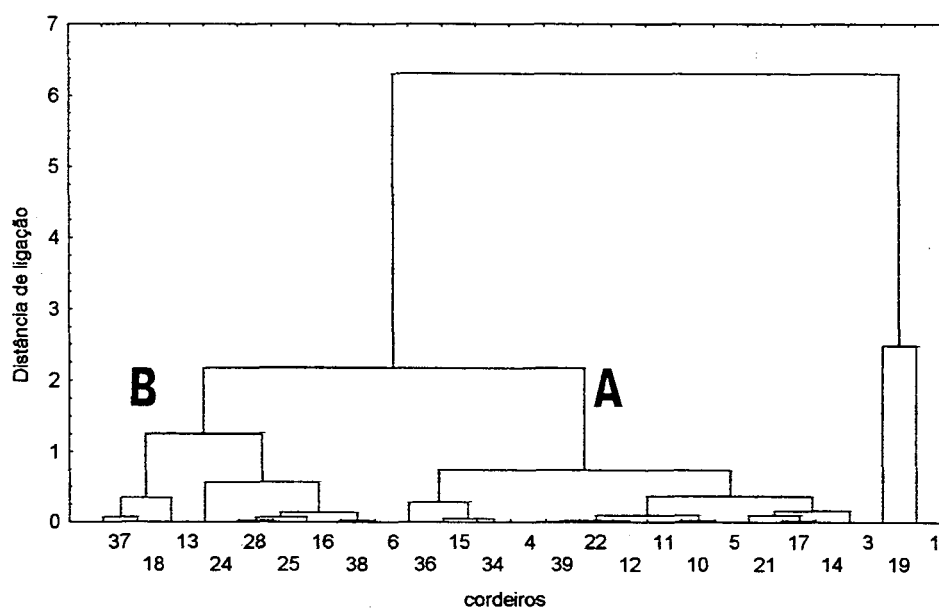
Para a terceira hipótese, o diagrama obtido separou os grupos A e B ao nível de 2,21 de distância (GRÁFICO 33). Foram nove animais de alto opg incluídos no grupo B e 14 de baixo opg no grupo A. Os animais 01 e 19 foram excluídos pela análise por apresentarem valores muito elevados de opg: 27.900 e 16.900, respectivamente. Estes animais podem ser considerados altamente susceptíveis, por sua elevada contagem de opg, diferenciando-os dos outros animais do mesmo rebanho.

GRÁFICO 32 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES DA DÉCIMA COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADA EM 09 DE FEVEREIRO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

GRÁFICO 33 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES DA 14.ª COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADA EM 04 DE MAIO DE 1999



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

O teste t realizado entre os grupos resistente e susceptível nas três hipóteses estudadas revelou diferenças significativas para  $p < 0,001$  no opg da coleta sobre a qual foi realizado cada agrupamento (TABELA 16; ANEXO VI). Entre os grupos formados pela hipótese 1, somente foram detectadas diferenças no opg de coletas anteriores ao pico de parasitismo utilizado para o agrupamento, bem como uma diferença de baixa significância para o início do terceiro pico (coleta 9). Para os grupos formados pelas hipóteses 2 e 3, foram detectadas diferenças no opg da coleta 6 (imediatamente após o segundo pico de parasitismo), do terceiro e do quarto pico de verminose.

Para o número de eosinófilos sanguíneos, foi detectada diferença significativa entre cordeiros resistentes e susceptíveis pela hipótese 1 somente para dados da nona coleta, coincidente com o início do terceiro pico de verminose. Os grupos formados pela hipótese 2 mostraram diferença no número de eosinófilos para a terceira coleta, bem como para a quinta (coincidente com o segundo pico de parasitismo) e décima coleta, sobre a qual foi realizado o agrupamento. Para a hipótese 3, os grupos formados mostraram diferença para o número de eosinófilos das coletas 13 e 15, as imediatamente anterior e posterior à qual foi utilizada para o agrupamento.

Para a IgE total e específica, os grupos formados pela primeira hipótese mostraram diferença significativa para os valores de quase todas as coletas (TABELA 16). Para a segunda hipótese, apenas o valor de IgE total da 14.<sup>a</sup> coleta, coincidente com o quarto pico de parasitismo, diferiu estatisticamente. A terceira hipótese mostrou diferenças para IgE total nas coletas 5 (coincidente com o segundo pico de parasitismo) e 15 (posterior ao quarto pico), bem como para a IgE específica da coleta 3.

Os valores de IgG foram diferentes entre os grupos formados para a primeira hipótese apenas na coleta 5, sobre a qual se realizou o agrupamento pelo opg (TABELA 16). Para a hipótese 2, foram detectadas diferenças nos dados das coletas 8, 14 e 15. Para a hipótese 3, apenas os dados de IgG da primeira coleta foram estatisticamente diferentes.

TABELA 16 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS COM BASE NO OPG DO SEGUNDO (HIPÓTESE 1), TERCEIRO (HIPÓTESE 2) OU QUARTO PICO DE VERMINOSE (HIPÓTESE 3) PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT

VARIÁVEL	COLETA	H1	H2	H3	VARIÁVEL	COLETA	H1	H2	H3
OPG	1 (06/10/98)	**	NS	NS	IGE TOTAL	1 (06/10/98)	NS	NS	NS
	2 (23/10/98)	NS	*	NS		3 (03/11/98)	NS	NS	*
	3 (03/11/98)	***	NS	NS		5 (01/12/98)	**	NS	NS
	4 (17/11/98)	**	NS	NS		8 (12/01/99)	NS	NS	NS
	5 (01/12/98)	***	NS	NS		10 (09/02/99)	+	NS	NS
	6 (15/12/98)	NS	**	*		12 (09/03/99)	+	NS	NS
	7 (29/12/98)	NS	NS	NS		13 (06/04/99)	***	NS	NS
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS		14 (04/05/99)	*	+	NS
	9 (26/01/99)	+	NS	NS		15 (01/06/99)	*	NS	NS
	10 (09/02/99)	NS	***	+	IGE ESPECÍFICA	1 (06/10/98)	NS	NS	NS
	11 (23/02/99)	NS	*	NS		3 (03/11/98)	+	NS	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	*		5 (01/12/98)	***	NS	+
	13 (06/04/99)	NS	NS	*		8 (12/01/99)	**	NS	NS
	14 (04/05/99)	NS	+	***		10 (09/02/99)	NS	NS	NS
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS		12 (09/03/99)	*	NS	NS
EOSINÓ-FILOS	1 (06/10/98)	NS	NS	NS		13 (06/04/99)	***	NS	NS
	2 (23/10/98)	NS	NS	NS		14 (04/05/99)	**	NS	NS
	3 (03/11/98)	NS	+	NS		15 (01/06/99)	*	NS	*
	4 (17/11/98)	NS	NS	NS	IGG ESPECÍFICA	1 (06/10/98)	NS	NS	+
	5 (01/12/98)	NS	*	NS		3 (03/11/98)	NS	NS	NS
	6 (15/12/98)	NS	NS	NS		5 (01/12/98)	*	NS	NS
	7 (29/12/98)	NS	NS	NS		8 (12/01/99)	NS	+	NS
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS		10 (09/02/99)	NS	NS	NS
	9 (26/01/99)	+	NS	NS		12 (09/03/99)	NS	NS	NS
	10 (09/02/99)	NS	+	NS		13 (06/04/99)	NS	NS	NS
	11 (23/02/99)	NS	NS	NS		14 (04/05/99)	NS	+	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	NS		15 (01/06/99)	NS	+	NS
	13 (06/04/99)	NS	NS	*					
	14 (04/05/99)	NS	NS	NS					
	15 (01/06/99)	NS	NS	+					

NS – não significativo; +p<0,10; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Médias de cada grupo disponível no ANEXO VI

Ao comparar quais cordeiros foram classificados em cada grupo para as diferentes hipóteses, pode ser observado que nem sempre os mesmos indivíduos foram enquadrados nos mesmos grupos (TABELA 17). Apenas onze animais foram classificados sempre nos mesmos grupos: os cordeiros de brincos 01, 24, 25 e 28 como susceptíveis, e os de brincos 03, 10, 12, 14, 17, 22 e 36 como resistentes.

TABELA 17 – CLASSIFICAÇÃO DOS CORDEIROS EM RESISTENTES (R) OU SUSCEPTÍVEIS (S) DE ACORDO COM A ANÁLISE DE CLUSTER OBTIDA A PARTIR DO OPG DO SEGUNDO (HIPÓTESE 1), TERCEIRO (HIPÓTESE 2) OU QUARTO PICO DE VERMINOSE (HIPÓTESE 3)

CORDEIRO	HIPÓTESE 1	HIPÓTESE 2	HIPÓTESE 3
01	S	S	S
03	R	R	R
04	S	R	R
05	R	S	R
06	R	R	S
10	R	R	R
11	S	R	R
12	R	R	R
13	R	S	S
14	R	R	R
15	S	R	R
16	R	S	S
17	R	R	R
18	S	R	S
19	R	S	S
21	R	S	R
22	R	R	R
24	S	S	S
25	S	S	S
28	S	S	S
34	S	S	R
36	R	R	R
37	S	R	S
38	S	R	S
39	S	R	R

Quando se avalia a diferença entre os sete animais que foram considerados resistentes e os quatro considerados susceptíveis nas três hipóteses elaboradas, observa-se que as médias de opg dos dois grupos foram estatisticamente diferentes durante os três picos de parasitismo e nas coletas 2, 6 e 7 (TABELA 18). Para os eosinófilos circulantes, só foram detectadas diferenças nas médias dos grupos para a décima coleta. Para a IgG, as diferenças foram assinaladas na oitava e na décima quinta coleta. As médias de IgE total foram diferentes entre os grupos em todas as coletas, exceto as de 12 de janeiro e de 09 de fevereiro de 1999. Todas as médias de IgE específica após a quinta coleta foram consideradas significativas para  $p < 0,10$ .

TABELA 18 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS COM BASE NO OPG DOS TRÊS PICOS DE OPG PÓS DESMAME PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT

VARIÁVEL	COLETA	continua		
		MÉDIA <sup>(1)</sup> GRUPO RESISTENTE	MÉDIA <sup>(1)</sup> GRUPO SUSCEPTÍVEL	
OPG	1 (06/10/98)	1,2874	2,4900	NS
	2 (23/10/98)	0,2863	1,5287	+
	3 (03/11/98)	0,5727	1,6965	NS
	4 (17/11/98)	1,9802	2,5445	NS
	5 (01/12/98)	2,6150	3,5151	***
	6 (15/12/98)	0,6681	2,9348	**
	7 (29/12/98)	4,2971	6,9332	+
	8 (12/01/99)	5,2300	6,7715	NS
	9 (26/01/99)	7,1836	8,3048	+
	10 (09/02/99)	7,2390	8,7720	**
	11 (23/02/99)	2,9785	5,6790	NS
	12 (09/03/99)	1,3186	3,4613	NS
	13 (06/04/99)	7,1184	7,7606	NS
	14 (04/05/99)	5,7235	8,9583	+
	15 (01/06/99)	4,2684	4,1177	NS
EOSINÓFILOS	1 (06/10/98)	1,7168	1,6416	NS
	2 (23/10/98)	1,8483	1,9566	NS
	3 (03/11/98)	1,8999	1,8060	NS
	4 (17/11/98)	1,7607	1,7931	NS
	5 (01/12/98)	1,7644	1,6110	NS
	6 (15/12/98)	1,6119	1,6070	NS
	7 (29/12/98)	1,9549	2,0734	NS
	8 (12/01/99)	2,2687	1,9600	NS
	9 (26/01/99)	1,7294	1,7574	NS
	10 (09/02/99)	2,0418	1,8672	+
	11 (23/02/99)	2,1810	2,1580	NS
	12 (09/03/99)	2,2163	2,1758	NS
	13 (06/04/99)	2,0480	1,7886	NS
	14 (04/05/99)	2,2591	2,2992	NS
	15 (01/06/99)	2,3928	1,9425	NS
IGE TOTAL	1 (06/10/98)	0,5320	-0,0846	*
	3 (03/11/98)	0,7394	0,3076	*
	5 (01/12/98)	1,0261	0,2900	*
	8 (12/01/99)	0,7429	0,6677	NS
	10 (09/02/99)	0,8820	0,7562	NS
	12 (09/03/99)	0,9227	0,5294	*
	13 (06/04/99)	1,0417	0,5958	*
	14 (04/05/99)	0,9901	0,3333	*
	15 (01/06/99)	1,0241	0,6759	*



TABELA 18 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS COM BASE NO OPG DOS TRÊS PICOS DE OPG PÓS DESMAME PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT

VARIÁVEL	COLETA	MÉDIA GRUPO RESISTENTE <sup>(1)</sup>	MÉDIA GRUPO SUSCEPTÍVEL <sup>(1)</sup>	conclusão	
IGE ESPECÍFICA	1 (06/10/98)	-1,3188	-1,5669	NS	
	3 (03/11/98)	-1,2952	-1,5806	NS	
	5 (01/12/98)	-1,2620	-1,9929	**	
	8 (12/01/99)	-1,1368	-2,0418	**	
	10 (09/02/99)	-1,0944	-1,6419	+	
	12 (09/03/99)	-0,9893	-1,7660	*	
	13 (06/04/99)	-0,6049	-1,7359	*	
	14 (04/05/99)	-0,6243	-1,4953	*	
	15 (01/06/99)	-0,5489	-1,5786	*	
IGG ESPECÍFICA	1 (06/10/98)	-0,7316	-0,9093	NS	
	3 (03/11/98)	-0,7389	-0,8377	NS	
	5 (01/12/98)	-0,5536	-0,7032	NS	
	8 (12/01/99)	-0,3843	-0,5758	*	
	10 (09/02/99)	-0,3246	-0,4379	NS	
	12 (09/03/99)	-0,3805	-0,3745	NS	
	13 (06/04/99)	-0,4232	-0,4930	NS	
	14 (04/05/99)	-0,3993	-0,5052	NS	
	15 (01/06/99)	-0,3591	-0,5003	+	

(1) Médias calculadas para as variáveis submetidas à transformação logarítmica

NS – não significativo; +p<0,10; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

### 5.10.3 Seleção indireta dos cordeiros em resistentes e susceptíveis ao parasitismo com base na IgE sérica total e na IgE anti-*Haemonchus contortus*

Considerando-se que a IgE total e a IgE específica foram as variáveis imunológicas cujas médias do grupo susceptível e resistente foram estatisticamente diferentes para um maior número de coletas, as seguintes hipóteses de seleção indireta foram elaboradas para avaliar a utilidade destes marcadores:

- A- agrupamento dos animais baseado nos dados de IgE específica das coletas 5 (segundo pico de parasitismo), 8 (anterior ao terceiro pico de parasitismo) e 14 (quarto pico de parasitismo);
- B- agrupamento baseado nos dados de IgE específica das coletas 5, 10 e 14 (relativas ao segundo, terceiro e quarto pico de parasitismo, respectivamente);
- C- agrupamento baseado nos dados de IgE total das coletas 5 (segundo pico de parasitismo), 8 (anterior ao terceiro pico de parasitismo) e 14 (quarto pico de parasitismo);
- D- agrupamento baseado nos dados de IgE total das coletas 5, 10 e 14 (relativas ao segundo, terceiro e quarto pico de parasitismo, respectivamente)

O dendrograma construído com os dados propostos na hipótese A revelou a formação de dois grupos (A e B) ao nível de 1,600 de distância (GRÁFICO 34). O grupo A incluiu quatro cordeiros cujos valores de densidades ópticas foram elevados, correspondendo ao grupo “*high responder*”. O grupo B foi subdividido ao nível de 1,134 em dois subgrupos. O subgrupo B1 compreendeu oito animais de resposta intermediária, enquanto o subgrupo B2, nove animais de baixos valores de densidade

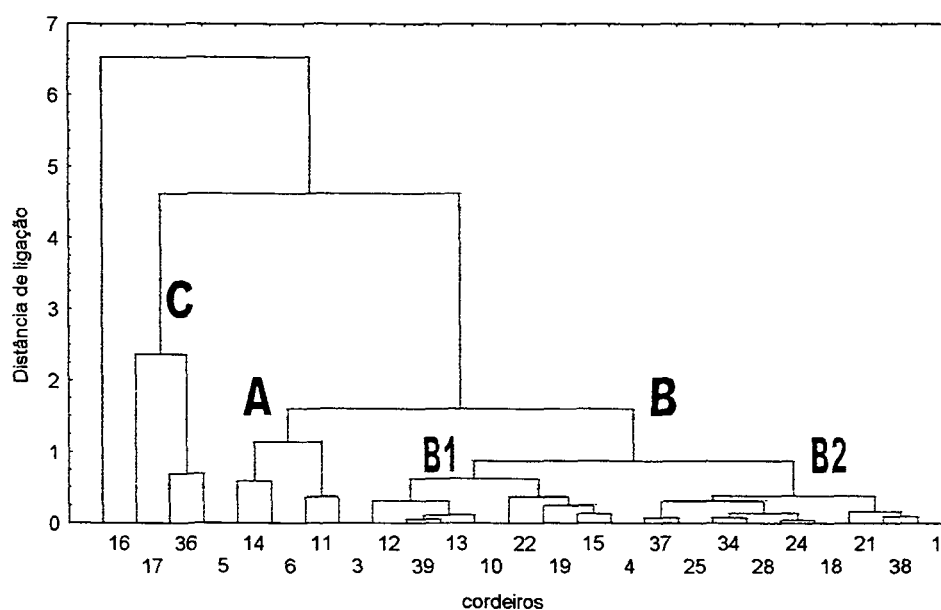
óptica, correspondendo ao grupo “*low responder*”. Além dos grupos A e B foi observada a formação de um terceiro grupo (C) ao nível de 4,616 de distância. Este grupo compreendeu três animais de valores altíssimos de DO para IgE específica. O cordeiro 16 foi excluído da análise por apresentar valor individual de 0,946 na quinta coleta. Este animal e os cordeiros do grupo C também foram considerados “*high responders*”.

Para a hipótese B, os grupos A e B foram formados ao nível de 1,717 de distância e compreenderam os mesmos animais que a hipótese A (GRÁFICO 35). Contudo, o grupo B foi dividido em três subgrupos, dos quais o subgrupo B3 representou os animais de menores DO para IgE específica, portanto, “*low responders*”. Como para a hipótese A, os animais 05, 16, 17 e 36 foram excluídos dos grupos A e B por apresentarem altos valores de DO para IgE específica, sendo incluídos no grupo “*high responder*”.

Quando a hipótese C foi submetida à análise de Cluster, foi observado a formação de dois grupos, A e B, ao nível de 5,093 de distância (GRÁFICO 36). O grupo A compreendeu seis animais cujos valores de IgE total foram elevados. Por isto, este grupo foi considerado “*high responder*”. O grupo B foi subdividido em dois, ao nível de 2,715 de distância. O subgrupo B1 englobou animais de respostas intermediárias enquanto o B2, animais considerados “*low responders*”.

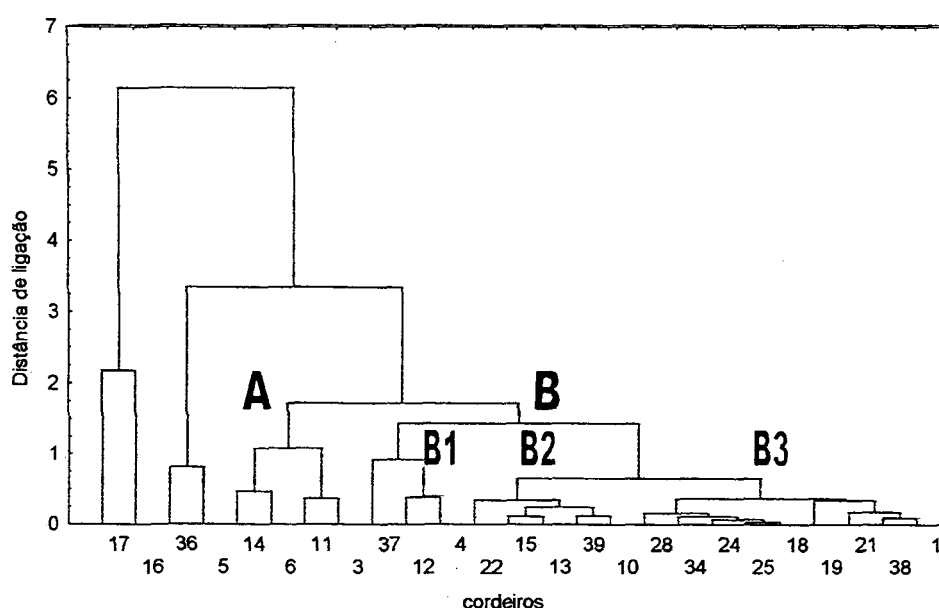
Para a hipótese D, um agrupamento semelhante foi obtido, com a formação do grupo A, com animais de altos valores de IgE total, separado do grupo B ao nível de 6,114 de distância (GRÁFICO 37). O grupo B foi subdividido ao nível de 2,853 no subgrupo B1, com oito animais de resposta intermediária, e B2, com doze animais de baixos níveis de IgE sérica total.

GRÁFICO 34 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) E DE IGE ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* DA 5.<sup>a</sup>, 8.<sup>a</sup> E 14.<sup>a</sup> COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 12 DE JANEIRO E 04 DE MAIO DE 1999



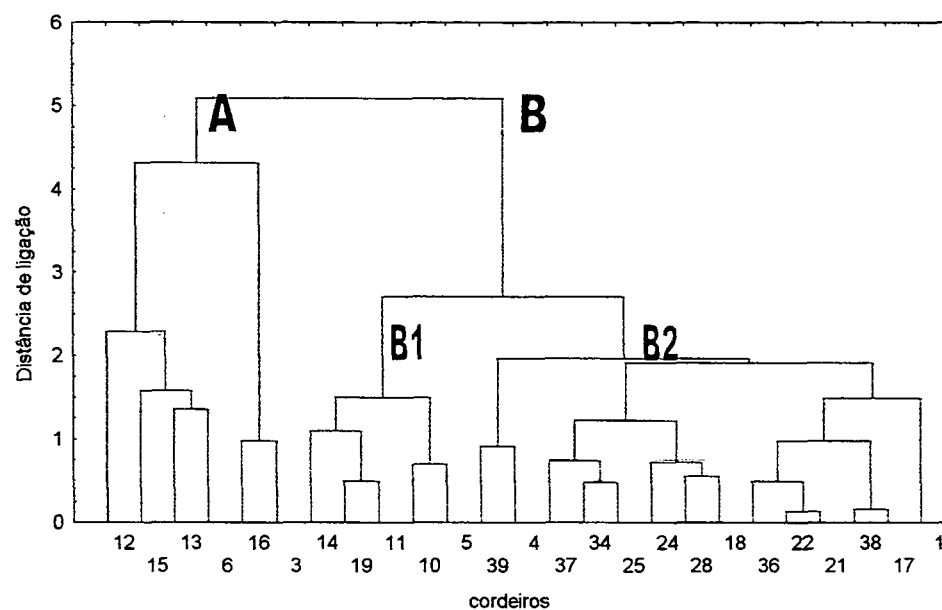
NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

GRÁFICO 35 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) E DE IGE ANTI-*HAEMONCHUS CONTORTUS* DA 5.<sup>a</sup>, 10.<sup>a</sup> E 14.<sup>a</sup> COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 09 DE FEVEREIRO E 04 DE MAIO DE 1999



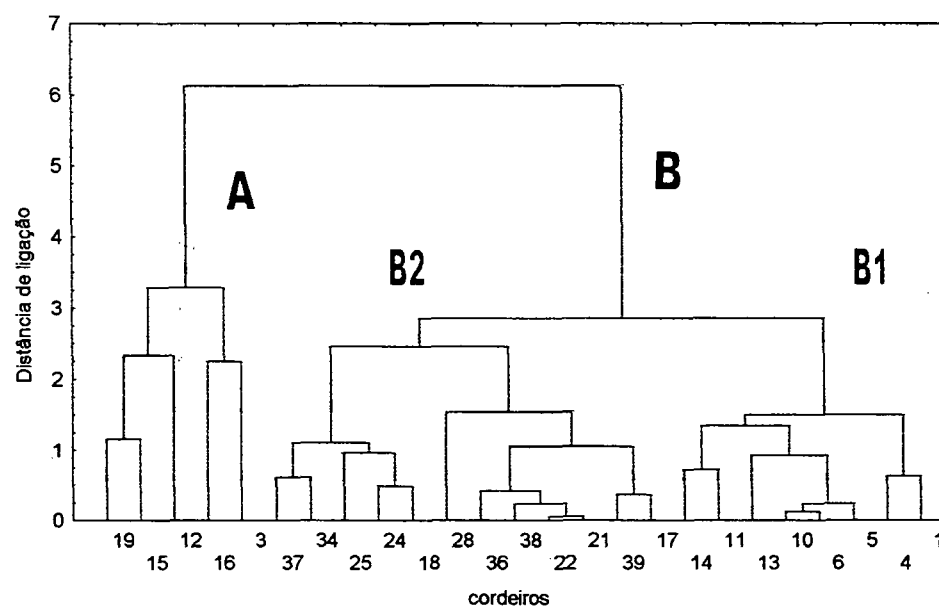
NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

**GRÁFICO 36 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) E DE IGE TOTAL DA 5.<sup>a</sup>, 8.<sup>a</sup> E 14.<sup>a</sup> COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 12 DE JANEIRO E 04 DE MAIO DE 1999**



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

**GRÁFICO 37 - DENDROGRAMA CONSTRUÍDO COM OS DADOS DE OVOS DE HELMINTOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) E DE IGE TOTAL DA 5.<sup>a</sup>, 10.<sup>a</sup> E 14.<sup>a</sup> COLETA DOS CORDEIROS, REALIZADAS EM 01 DE DEZEMBRO DE 1998, 09 DE FEVEREIRO E 04 DE MAIO DE 1999**



NOTA: O agrupamento foi realizado pelas linhas completas e a ligação foi dada em distância euclidiana

Quando se compara a média de opg dos grupos “*high responder*” e “*low responder*” observa-se diferenças significativas em várias coletas (TABELA 19). Quando o agrupamento foi realizado com base na IgE específica (hipóteses A e B), as diferenças foram mais evidentes, e foram observadas durante períodos de baixo opg (coletas 1, 3, 6 e 12), bem como no segundo (coleta 5), terceiro (coletas 9 e 10) e quarto (coletas 13 e 14) picos de parasitismo. Quando o agrupamento foi realizado com base na IgE total, foram detectadas diferenças nas médias de opg apenas fora dos picos de parasitismo.

Não foram detectadas diferenças na média de eosinófilos circulantes entre os grupos classificados como “*high responder*” e “*low responder*”. A única exceção foi a hipótese D, cujos grupos formados mostraram diferenças para as médias de eosinófilos das coletas 9 ( $p<0,05$ ) e 11 ( $p<0,10$ ) (TABELA 19).

Para IgE total, foram detectadas diferenças significativas entre as médias dos grupos nas coletas 5, 14 e 15 para todas as hipóteses de agrupamento. As hipóteses C e D mostraram diferenças entre as médias dos grupos para todas as coletas, exceto para a 13.<sup>a</sup>. As médias da quinta e oitava coletas, sobre as quais foi realizado o agrupamento na hipótese C, foram as únicas cujas diferenças foram significativas para  $p<0,001$ .

Os grupos formados pelas hipóteses A e B, que utilizaram a IgE específica como marcador, mostraram diferenças nas médias desta variável para todas as coletas. Para a hipótese C, diferenças entre as médias dos grupos foram detectadas nas coletas 3 ( $p<0,05$ ), 5 ( $p<0,05$ ), 10 ( $p<0,10$ ) e 15 ( $p<0,05$ ). Para a hipótese D, foi assinalada diferença apenas na coleta 3 ( $p<0,05$ ).

As médias de IgG específica foram significativamente diferentes para as hipóteses A e B nas coletas 5, 8 14 e 15. Para hipótese B, uma pequena diferença ( $p<0,10$ ) também foi observada para a 13.<sup>a</sup> coleta. A hipótese C revelou diferenças nas médias de IgG entre os grupos para todas as coletas, exceto a primeira. Para a hipótese D, a única coleta que revelou diferença ( $p<0,10$ ) entre a média de IgG do grupo “*high responder*” e do “*low responder*” foi a terceira.

TABELA 19 – DIFERENÇA ENTRE OS ANIMAIS CLASSIFICADOS COMO “*HIGH RESPONDERS*” E “*LOW RESPONDERS*” AOS PARASITOS GASTRINTESTINAIS COM BASE NA IGE ESPECÍFICA DAS COLETAS 5, 8 E 14 (HIPÓTESE A); 5, 10 E 14 (HIPÓTESE B); IGE TOTAL DAS COLETAS 5, 8 E 14 (HIPÓTESE C); 5, 10 E 14 (HIPÓTESE D); PARA AS VARIÁVEIS OPG, NÚMERO DE EOSINÓFILOS SANGUÍNEOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS, DE ACORDO COM O TESTE T DE STUDENT

VARIÁVEL	COLETA	HA	HB	HC	HD	VARIÁVEL	COLETA	HA	HB	HC	HD
OPG	1 (06/10/98)	NS	+	**	*	IGE	1 (06/10/98)	*	+	**	**
	2 (23/10/98)	NS	NS	NS	NS	TOTAL	3 (03/11/98)	+	NS	+	*
	3 (03/11/98)	+	+	NS	NS		5 (01/12/98)	**	**	***	*
	4 (17/11/98)	NS	NS	NS	NS		8 (12/01/99)	NS	NS	***	+
	5 (01/12/98)	*	+	NS	NS		10 (09/02/99)	+	NS	*	*
	6 (15/12/98)	*	**	NS	NS		12 (09/03/99)	NS	NS	+	+
	7 (29/12/98)	NS	NS	*	NS		13 (06/04/99)	*	+	NS	NS
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS	NS		14 (04/05/99)	*	*	*	*
	9 (26/01/99)	+	+	NS	NS		15 (01/06/99)	**	*	**	**
	10 (09/02/99)	+	**	NS	NS						
	11 (23/02/99)	NS	NS	NS	NS	IGE	1 (06/10/98)	+	+	NS	NS
	12 (09/03/99)	*	*	*	NS	ESPECÍFICA	3 (03/11/98)	*	*	*	*
	13 (06/04/99)	NS	NS	NS	NS		5 (01/12/98)	***	***	*	NS
	14 (04/05/99)	+	+	NS	NS		8 (12/01/99)	**	**	NS	NS
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS	NS		10 (09/02/99)	*	**	+	NS
EOSINÓ- FILOS	1 (06/10/98)	NS	NS	NS	NS		12 (09/03/99)	**	***	NS	NS
	2 (23/10/98)	NS	NS	NS	NS		13 (06/04/99)	***	***	NS	NS
	3 (03/11/98)	NS	NS	NS	NS		14 (04/05/99)	***	***	NS	NS
	4 (17/11/98)	NS	NS	NS	NS		15 (01/06/99)	***	***	*	NS
	5 (01/12/98)	NS	NS	NS	NS						
	6 (15/12/98)	NS	NS	NS	NS	IGG	1 (06/10/98)	NS	NS	NS	NS
	7 (29/12/98)	NS	NS	NS	NS	ESPECÍFICA	3 (03/11/98)	NS	NS	*	+
	8 (12/01/99)	NS	NS	NS	NS		5 (01/12/98)	**	**	**	NS
	9 (26/01/99)	NS	NS	NS	*		8 (12/01/99)	+	+	*	NS
	10 (09/02/99)	NS	NS	NS	NS		10 (09/02/99)	NS	NS	*	NS
	11 (23/02/99)	NS	NS	NS	+		12 (09/03/99)	NS	NS	*	NS
	12 (09/03/99)	NS	NS	NS	NS		13 (06/04/99)	NS	+	*	NS
	13 (06/04/99)	NS	NS	NS	NS		14 (04/05/99)	+	*	+	NS
	14 (04/05/99)	NS	NS	NS	NS		15 (01/06/99)	*	**	**	NS
	15 (01/06/99)	NS	NS	NS	NS						

NS – não significativo; +p<0,10; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Médias de cada grupo disponível no ANEXO VII

Quando foi estudada a resposta imune de animais adultos às parasitoses, foi observado que todos os animais do rebanho tiveram um comportamento definido perante o desafio parasitário. Por isso, cada animal pôde ser classificado no grupo resistente ou susceptível às parasitoses independente da hipótese de seleção formulada.

Contudo, quando os dados dos cordeiros foram analisados, não houve correspondência entre os grupos resistente e susceptível formados em cada pico de parasitismo. Vários animais se comportaram ora como resistentes, ora como susceptíveis, contribuindo para a obtenção de valores nulos de repetibilidade do opg. Isto pode ser reflexo da incapacidade de alguns cordeiros em expressar um padrão de resposta imune definido aos parasitos gastrintestinais até o final do acompanhamento. A divergência na obtenção de diferenças estatisticamente significativas entre as médias das variáveis imunológicas dos grupos formados para cada pico de parasitismo confirmaria esta hipótese.

MORRIS *et al.* (1997, p.319-329) descreve uma prova de reprodutores na qual a média de opg da progênie de cada carneiro é analisada nos três primeiros picos de verminose após o desmame. Neste esquema, diferenças entre o opg de cordeiros de linhas resistentes e susceptíveis já são significativas mesmo na primeira amostragem, e ficam ainda mais evidentes ao longo do acompanhamento (DOUCH *et al.*, 1995, p.126). Por analogia, seria esperado que pelo menos um pequeno grupo de cordeiros de um rebanho "comum", que não tenha sofrido prévia seleção para resistência, apresentasse uma definição quanto à resistência ou susceptibilidade à verminose gastrintestinal após três picos de infecção natural pós-desmame.

Neste trabalho, dos 25 animais estudados, quatro foram classificados como susceptíveis e sete como resistentes em todas as hipóteses. Considerando-se que cada grupo era formado somente por estes animais, foi observado que a média de opg do grupo resistente foi estatisticamente menor para todos os picos de parasitismo. Estes dados indicam a possibilidade de identificar alguns cordeiros resistentes e susceptíveis a partir de um rebanho "comum", com base nos dados de opg dos três primeiros picos



de verminose após o desmame. Assim, a metodologia proposta seria viável para a identificação de borregos resistentes para seleção e teste de progênie.

A igualdade estatística entre os dados de eosinófilos de cordeiros resistentes e susceptíveis assinalada neste trabalho foi de encontro ao observado para as ovelhas adultas. Para elas, o eosinófilo foi o marcador imunológico que traduziu mais fielmente as mudanças no opg. Esta diferença no comportamento de animais adultos e jovens também foi observada por SOTOMAIOR (1997, p.77) e pode ser decorrente da incapacidade dos cordeiros em manifestar uma resposta imune completa à verminose.

Para IgG, apesar dos trabalhos de DOUCH *et al.* (1995, p.126; 1996, p.904-906) mostrarem divergência entre animais de linhagens resistentes e susceptíveis à parasitose gastrintestinal, os resultados aqui obtidos não mostraram diferenças significativas entre os grupos. Isso não era totalmente inesperado, uma vez que nem mesmo para as ovelhas adultas, com uma resposta definida contra a parasitose, foi observada diferença nos níveis de IgG específica entre os grupos.

Para IgE total e específica, as diferenças entre os cordeiros resistentes e susceptíveis foram significativas para sete das nove coletas realizadas. Isto está de acordo com os resultados de (SHAW *et al.* 1999, p.29), para dados de linhas resistentes e susceptíveis separadas ao longo de várias gerações.

Como as médias de destas variáveis tenderam a apresentar diferenças entre os grupos durante a maior parte do acompanhamento, foi analisada a possibilidade de se selecionar animais resistentes e susceptíveis indiretamente pela IgE total ou específica. As hipóteses de seleção indireta baseadas na IgE total não revelaram grupos com médias de opg contrastantes durante os picos de parasitismo. Como a IgE total é uma medida de respostas específicas e inespecíficas ao parasito (KOOYMANN, 1997, p.405), era esperado que sua relação com a resistência aos helmintos gastrintestinais fosse menos estreita que a da IgE específica.

Ambas as hipóteses elaboradas para a identificação de animais "*high responders*" e "*low responders*" por meio da mensuração da IgE específica mostraram

diferenças significativas para o opg de ambos os grupos nos três picos de parasitismo acompanhados. Isso indica que a seleção indireta de animais resistentes e susceptíveis com base na IgE anti-*Haemonchus* seria viável, conforme proposto por SHAW *et al.* (1999, p.31).

Apesar de ainda não ter sido testada na prática, a seleção indireta pela IgE específica teria algumas vantagens sobre a seleção pelo opg. A primeira seria os valores de repetibilidade mais elevados que os do opg, diminuindo a necessidade de múltiplas amostragens dos animais para seleção. Além disso, SHAW *et al.* (1999, p.30) relatam maior herdabilidade para IgE anti-*T.colubriformis* (0,36-0,52) que para o opg (0,27-0,36). As outras vantagens são decorrentes da utilização do teste de enzima-imunoensaio para a obtenção dos valores individuais de densidades ópticas, tais como: leitura automatizada, estocagem das amostras por longos períodos e análise de um grande número de animais ao mesmo tempo (DOUCH *et al.*, 1995, p.127).

## 6 CONCLUSÃO

1. Foi possível a produção de um antígeno somático de *Haemonchus contortus* e a padronização de uma técnica de imunoensaio para a detecção de anticorpos da classe de imunoglobulina G (IgG) ovina.
2. Ovinos adultos apresentaram um padrão de resposta à verminose definido para cada animal, o que possibilitou que cada indivíduo fosse identificado como resistente ou susceptível pelo número de ovos de helmintos por grama de fezes.
3. Ovelhas resistentes tiveram menores médias de ovos de helmintos por grama de fezes e maiores médias de eosinófilos que as susceptíveis. O nível de anticorpos se mostrou variável entre os grupos, mas houve uma tendência do grupo susceptível em apresentar menores médias de IgE e maiores de IgG específica que o grupo resistente.
4. Tanto o número de eosinófilos quanto a IgE específica poderiam ser utilizados concomitantemente com o marcador parasitológico para a identificação de ovelhas resistentes e susceptíveis, sobretudo quando o objetivo do programa de seleção é o descarte de animais susceptíveis e a manutenção do maior número possível de fêmeas resistentes no plantel.
5. O número de eosinófilos sanguíneos foi o único marcador imunológico que permitiu classificar as ovelhas indiretamente nos mesmos grupos obtidos para o marcador parasitológico.
6. Os cordeiros mostraram uma estabilização no comportamento das variáveis imunológicas por volta dos seis meses e meio de idade, indicando a definição de um padrão de resposta imune aos helmintos gastrintestinais. Contudo, esta resposta não foi completa e, em alguns animais, variou conforme o pico de parasitismo.
7. A identificação de cordeiros resistentes só foi possível com os dados de ovos de helmintos por grama de fezes dos três picos de parasitose pós-desmame.

8. Cordeiros resistentes tenderam a ter maiores médias de eosinófilos circulantes, IgE total, IgE e IgG específicas que os susceptíveis, mas somente para IgE total e específica as diferenças foram significativas durante a maior parte do acompanhamento.
9. Foi possível identificar indiretamente cordeiros de alto e baixo opg pelos dados de IgE específica, medidos durante os três picos de parasitismo.
10. Tanto para seleção direta pelo opg quanto indireta pela IgE anti-*H. contortus*, foram necessários dados dos três picos de parasitismo pós-desmame. Portanto, para ambos os marcadores, os cordeiros somente puderam ser selecionados quando tinham uma média de idade de 10 meses.
11. Todas as variáveis imunológicas estudadas foram correlacionadas positivamente entre si. O número de eosinófilos circulantes, IgE total e específica foram correlacionados negativamente com o número de ovos de helmintos por grama de fezes
12. A IgG específica foi a única variável imunológica a ser correlacionada positivamente com o número de ovos de helmintos por grama de fezes quando dados de todas as coletas foram analisados. Quando dados de cada coleta das ovelhas foram analisados separadamente, também houve uma maior tendência de se formarem correlações positivas. Os cordeiros mostraram esta tendência apenas nas coletas correspondentes e posteriores ao terceiro pico de parasitismo pós-desmame, antes das quais as correlações foram negativas.
13. Foram assinaladas correlações de -0,50 e +0,38 entre o número de ovos de helmintos por grama de fezes e a idade dos cordeiros para o primeiro e o segundo picos de parasitismo pós-desmame em cordeiros
14. Excetuando a densidade óptica para pesquisa de IgE específica, nenhum outro caracter imunológico foi correlacionado à idade dos cordeiros após os 5 meses de idade

15. As correlações entre o número de ovos de helminto por grama de fezes e o peso do cordeiro ao nascer ou ao desmame tenderam a ser positivas. O mesmo foi observado entre o número de eosinófilos e as medidas de peso.
16. As correlações entre os anticorpos (IgE total, IgE e IgG específica) e o peso do cordeiro ao nascer tenderam a ser negativas, de nível médio a elevado. Contudo, poucas ou nenhuma correlação significativa foi assinalada entre os anticorpos e o peso ao desmame.
17. As correlações obtidas entre as variáveis parasito e imunológicas de mães e filhos foram positivas, de nível baixo a intermediário. Isto indica certo grau de determinação genética no comportamento do animal à parasitose, mas também forte influência ambiental.

## PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresentou proposta de seleção de animais baseado em sua performance individual. Resta testar cada uma destas hipóteses no campo, a fim de observar o ganho genético nas gerações subsequentes. Além disso, há possibilidade de formar linhas de animais resistentes e susceptíveis, por meio do cruzamento seletivo entre animais do mesmo grupo por muitas gerações. A manutenção das linhas deveria ser realizada em uma Universidade ou centro de pesquisa, com estrutura para manutenção das linhas e realização dos testes de progênie dos reprodutores. Além de fins experimentais, a manutenção da linhagem de animais resistentes deveria atender à demanda de criadores de todo o Estado, pelo fornecimento de carneiros provados.

A seleção de animais resistentes e susceptíveis também possibilitaria o estudo de marcadores genéticos de resistência. Uma vez identificados para cada raça, os marcadores genéticos moleculares apresentam grande superioridade sobre os fenotípicos, pois podem ser acessados em qualquer momento da vida de um animal, independentemente da idade ou infecção prévia por parasitos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 3.ed. Tradução: Raimundo Gesteira e Lourdes Isaac. Rio de Janeiro: Editora Revinter Ltda., 2000. 486 p. Tradução de: Cellular and Molecular Immunology.
- ALBERS, G.A.A; GRAY, G.D.; PIPER, L.R.; BARKER, J.S.F.; LE JAMBRE, L.F.; BARGER, I.A. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young Merino sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 17, n. 7, p. 1355-1363, 1987.
- ALBERS, G.A.A; GRAY, G.D.; LE JAMBRE, L.F.; BARGER, I.A.; BARKER, J.S.F. The effect of *Haemonchus contortus* infection on haematological parameters in young merino sheep and its significance for productivity. **Animal Production**, v. 50, p. 99-109, 1990.
- ALLONBY, E.W.; URQUHART, G.M. Self-cure of *Haemonchus contortus* infection under field conditions. **Parasitology**, v. 66, p. 43-53, 1973.
- ALMERIA, S.; CANALS, A.; ZARLENGA, S.; GASBARRE, L.C. Quantification of cytokine gene expression in lamina propria lymphocytes of cattle following infection with *Ostertagia ostertagi*. **Journal of Parasitology**, v.83, n.6, p.1051-1055, 1997.
- AMARANTE, A.F.T.; CRAIG, T.M.; RAMSEY, W.S.; DAVIS, S.K.; BAZER, F.W. Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Ramboillet and crossbreed lambs. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.311-324, 1999a.
- AMARANTE, A.F.T.; CRAIG, T.M.; RAMSEY, W.S.; EL-SAYED, N.M.; DESOUKI, A.Y.; BAZER, F.W. Comparison of naturally acquired parasite burdens among Florida Native, Rambouillet and crossbreed ewes. **Veterinary Parasitology** v.85 p.61-69. 1999b.
- ANDREWS, S.J.; ROLPH, T.P.; MUNN, E.A.; TAYLOR, M.A. Duration of protective immunity against ovine haemonchosis following vaccination with the nematode gut membrane antigen H11. **Research in Veterinary Science**, v. 62, n. 3, 1997, 223-227.
- BAHIRATHAN, M.; MILLER, J.E.; BARRAS, S.R.; KEARNEY, M.T. Susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongyle nematode infection. **Veterinary Parasitology** v.65. p.259-268. 1996.
- BAKER, R.L. Characterization and utilization of sheep and goat breeds that are resistant to helminths. In: Le JAMBRE, L.F.; KNOX, M.R. **Sustainable parasite control in small ruminants**. ACIAR Proceedings n.74. Bogor, Indonesia: ACIAR, 1996. p.172-177
- BECK, T.; MOIR, B.; MEPPEN, T. The cost of parasites to the Australian sheep industry. **Quarterly Review of the Rural Economy**, v. 7, p. 336-343, 1985.
- BEKELE, T.; KASALI, O.B.; REGE, J.E.O. Repeatability of measurements of packed cell volume and egg count as indicators of endoparasite load and their relationship with sheep productivity. **Acta Tropica**, v. 50, p. 151-160, 1992.
- BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; MORRIS, C.A.; SOUTHEY, B.R.; BAKER, R.L.; PARKER, A.G.H. Heritability of and genetic correlations among faecal egg counts and productivity traits in Romney sheep. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, n.35, p. 51-58, 1992.

BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; DOUCH, P.G.C.; JONAS, W.E.; WEST, C.J.; GREEN, R.S. Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm count. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 249-263, 1996.

BISSET, S.A.; WYK, J.A.; BATH, G.F.; MORRIS, C.A.; STENSON, M.O.; MALAN, F.S. Phenotypic and genetic relationships amongst FAMACHA score, faecal egg count and performance data in Merino sheep exposed to *Haemonchus contortus* infection in South Africa. In: International Sheep Veterinary Congress, 2001, Cape Town, South Africa. **Proceedings ... 1 CD-ROM**.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 42, p. 248-254, 1976.

BROWN, A.; GRIFFITHS, G.; BROPHY, P.M.; FURMIDGE, B.A.; PRITCHARD, D.I. Production and analysis of helminth excretory-secretory products. In : ROGAN, M.T. **Analytical Parasitology**. Verlag Belin Heidelberg: Springer, 1997. p. 83-125.

BUDDLE, B.M.; JOWETT, G.; GREEN, R.S.; DOUCH, P.G.C.; RISDON, P.L. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 7, p. 955-960, 1992.

CALUNIES-ROSS, I. Observations on the resistance of sheep to infection by the stomach worm *Haemonchus contortus*. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 5, p.147-157, 1932.

CAMPBELL, W.H. **BL483 Biochemistry Techniques – Lecture 1 – Protein Assay**. 1999. Disponível em: <http://www.bio.mtu.edu/campbell/bl482/lectures/lec1/Protein.html> Acesso em: 31 jan. 2001.

CROFTON, H.D. Nematode parasite populations in sheep on lowland farms. I. Worm egg counts in ewes. **Parasitology**, v. 44, p. 465-477, 1954.

CUQUERELLA, M.; GÓMEZ-MUÑOZ, M.T.; CARRERA, L.; FUENTE, C.; ALUNDA, J.M. Cross antigenicity among ovine trichostrongyloidea. Preliminary report. **Veterinary Parasitology**, v.53, p.243-251, 1994.

DAWKINS, H.J.S.; WINDON, R.G.; OUTERIDGE, P.M.; DINEEN, J.K. Cellular and humoral responses of sheep with different levels of resistance to *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 531-537, 1988.

DAWKINS, H.J.S.; WINDON, R.G.; EAGLESON, G.K. Eosinophil responses in sheep selected for high and low responsiveness to *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v. 19, n. 2, p. 199-205, 1989.

De SIMONE, C.; DONELLI, G.; MELI, D.; ROSATI, F.; SORICE, F. Human eosinophils and parasitic diseases. II. Characterisation of two cell fractions isolated at different densities. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 48, 249-255, 1982.

DINEEN, J.K.; GREGG, P.; LASCELLES, A.K. The response of lambs to vaccination at weaning with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae: segregation into “responders” and “non-responders”. **International Journal for Parasitology**, v. 8, p. 59-63, 1978.

DORCHIES, P.; BERGEAUD, J.P.; VAN KHANH, N.; MORAND, S. Reduced egg counts in mixed infections with *Oestrus ovis* and *Haemonchus contortus*: influence of eosinophils? **Parasitology Research**, v. 83, n. 7, p. 727-730, 1997.



DOUCH, P.G.C.; GREEN, R.S.; MORRIS, C.A.; BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; BAKER, R.L.; WATSON, T.G.; HURFORD, A.P.; WHEELER, M. Genetic and phenotypic relationships among anti-*Trichostrongylus colubriformis* antibody level, faecal egg count and body weight traits in grazing Romney sheep. **Livestock Production Science**, v.41, p. 121-132, 1995.

DOUCH, P.G.C.; GREEN, R.S.; MORRIS, C.A.; McEWANS, J.C.; WINDON, R.G. Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n.8/9, p. 899-911, 1996.

DOUCH, P.G.C.; GREEN, R.S.; RISDON, P.L. Antibody responses of sheep to challenge with *Trichostrongylus colubriformis* and the effect of dexamethasone treatment. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 921-928, 1994.

EADY, S. How to find highly productive rams that are worm resistant. **Nemesis**, Austrália, jun. 1997.

ECHEVARRIA, F. Resistência anti-helmíntica. In: PADILHA, T. **Controle dos Nematódeos Gastrintestinais em Ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA, 1996a. p. 53-75.

\_\_\_\_\_. Epidemiologia de nematódeos e controle estratégico em ovinos lanados. In: PADILHA, T. **Controle dos Nematódeos Gastrintestinais em Ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA, 1996b. p. 157-168.

GASBARRE, L.C. Effects of gastrointestinal nematode infection on the ruminant immune system. **Veterinary Parasitology**, v. 75, p. 327-343, 1997

GHULAM, R.; IQBAL, M.; KHAN, M.N.; HAYAT, B. Haematological disturbances associated with Haemonchosis in sheep. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 15, n. 4, p.159-162, 1995.

GIANNONI, M.A. & GIANNONI, M.L. **Genética e melhoramento de rebanhos nos trópicos**. 2. ed. São Paulo: Editora Nobel, 1989. 463p.

GILL, H.S. Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. **Parasite Immunology**, v. 13, p. 617-628, 1991.

GILL, H.S.; HUSBAND, A.J.; WATSON, D.L. Localization of immunoglobulin-containing cells in the abomasum of sheep following infection with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 31, p. 179-187, 1992.

GOMEZ-MUÑOZ, M.T.; CUQUERELLA, M.; FUENTE, C.; GÓMEZ-IGLESIAS, L.A.; ALUNDA, J.M. Infection-induced protection against *Haemonchus contortus* in Merino and Manchego sheep – relationship to serum antibody response. **Journal of Veterinary Medicine - Series B**, v.45, p. 449-459, 1998.

GORDON, H.McL.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50, 1939.

GORDON, H.McL. The epidemiology of parasitic diseases with special reference to studies with nematode parasites of sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 24, p. 17-45, 1948.

GREGORY, P.W.; MILLER, R.F.; STEWART, M.A. An analysis of environmental and genetic factors influencing stomach-worm infestations of sheep. **Journal of Genetics**, v. 39, p. 391-400, 1940.

HOUDIJK, J.G.M.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; HUNTLEY, J.F.; COOP, R.L. Can an increased intake of metabolizable protein affect the periparturient relaxation in immunity against *Teladorsagia circumcincta* in sheep? **Veterinary Parasitology**, v.91, p.43-62, 2000.

HOWARD, C.J.; MORRISON, W.I. The Leukocytes: Markers, tissue distribution and functional characterization. In: GODDEERIS, B.M.L.; MORRISON, W.I. **Cell-mediated immunity in ruminants**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1994 p. 1-17

ISRAF, D.A.; COOP, R.L.; STEVENSON, L.M.; JONES, D.G.; JACKSON, F.; JACKSON, E.; McKELLAR, A.; HUNTLEY, J.F. Dietary protein influences upon immunity to *Nematodirus battus* in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 273-296, 1996.

ISRAF, D.A.; JACKSON, F.; STEVENSON, L.M.; JONES, D.G.; JACKSON, E.; HUNTLEY, J.F.; COOP, R.L. Resistance of immunity to *Nematodirus battus* infections in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 1, p. 39-52, 1997.

JAIN, N.C. Comparative hematology of common domestic animals. In: \_\_\_\_\_. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.19-52, 1993.

JONAS, W.; STANKIEWICZ, M.; CHAMBERS, S. Effect of resistance status to nematodes on the density of sheep blood eosinophils. **Acta Parasitologica**, v.40, n.2, p.100-102, 1995.

KAMBARA, T.; McFARLANE, R.G. Changes in T cell subpopulations of sheep due age and dietary protein intake; association with protective immunity to *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 51, p.127-135, 1996.

KASSAI, T.; FÉSUS, L.; HENDRIKX, W.M.L. Is there a relationship between haemoglobin type and the innate resistance to *Haemonchus contortus* infection in Merino lambs? **Veterinary Parasitology**, v.37, p.61-77, 1990.

KIRAZOV, L.P.; VENKOV, L.G.; KIRAZOV, E.P. Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing fractions. **Analytical Biochemistry**, v.208, p.44-48, 1993.

KOOYMAN, F.N.J.; VAN KOOTEN, P.J.S.; HUNTLEY, J.F.; MacKELLAR, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A.; SCHALLIG, H.D.F.H. Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. **Parasitology**, v.114, p. 395-406, 1997.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação**. 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-275, 1951

Mac FARLANE, J.C.W.; CECIL, G.W. Eosinophil counting: a modification of Pilots method. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1187, 1951.

McCLURE, S.J.; EMERY, D.L. Cell Mediated Responses Against Gastrointestinal Nematodes Parasites of Ruminants. In: GODDEERIS, B.M.L.; MORRISON, W.I. **Cell-mediated immunity in ruminants**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1994 p. 213-228.

McCLURE, S.J.; EMMERY, D.L.; BENDIXSEN, T.; DAVEY, R.J. Attempts to generate immunity against *Trichostrongylus colubriformis* e *Haemonchus contortus* in young lambs by vaccination with viable parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 739-746, 1998.

- McEWAN, J. **Breeding sheep resistant to roundworm infection: Breeders' manual**. New Zealand Pastoral Agriculture Research Institute Limited (AgResearch), New Zealand, 1994.
- McMANUS, C.; MIRANDA, R.M. Comparação das raças de ovinos Santa Inês e Bergamácia no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.5, p.1055-1059, 1997.
- MEEUSEN, E.N.T. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.259-273, 1999.
- MELO, E. B. F.; CAMPOS, M. S. Nova técnica de coleta de helmintos parasitas intestinais. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 41, n.4, p.201-206, 1974.
- MILLER, J.E.; BAHIRATHAN, M.; LEMARIE, S.L.; HEMBRY, F.G.; KEARNEY, M.T.; BARRAS, S.R. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology**, v.74, n.1. p. 55-74, 1998.
- MINOZZO, J. **Teste de ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para imunodiagnóstico da cisticercose bovina**. Curitiba, Setembro de 1997. Universidade Federal do Paraná. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre-Sector de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 96 p.
- MORAES, F.R.; SARNOSKI Jr, S.; SAULT, J.P.E.; OLIVEIRA, V.P.; SOCCOL, V.T.; CASTRO, E.A. Estudo epidemiológico da verminose ovina na Região de Ponta Grossa - PR. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 6.,1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1998. p. 427.
- MORAES, F.R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; ROSSI JÚNIOR, P.; WOLFF, F.M.; CASTILHO, G.G. Susceptibilidade de ovinos das raças Suffolk e Santa Inês à infecção natural por tricostrongilídeos. **Arquives of Veterinary Science**, v.6, n.2, p.63-69, 2001.
- MOREIRA, E.C.; FAN, L.C.R.; SANTIAGO, M.A.M. Produção de hemoglobina C em resposta à estimulação parasitária (*Haemonchus contortus*) e anemia aguda experimental em ovinos. **A Hora Veterinária**, v. 2, n.7, p. 13-17, 1982
- MORRIS, C.A.; VLASSLOFF, A.; BISSET, S.A.; BAKER, R.L.; WEST, C.J.; HURFORD, A.P. Responses of Romney sheep to selection for resistance or susceptibility to nematode infection. **Animal Science**, v.64, p. 319-329, 1997.
- MUGAMBI, J.M.; BAIN, R.K.; WANYANGU, S.W.; IHIGA, M.A.; DUNCAN, J.L.; MURRAY, M.; STEAR, M.J. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology**, v.69, p. 265-273, 1997.
- NARI, A.; CARDOZO, H. Nematodos Gastrointestinales. In: **Enfermedades de los lanares - Tomo I**. Montevideo : Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., 1987. p.1-51.
- OLIVEIRA, V.P.; MORAES, F.R.; ZAGO, M.; POLLATI, L.; SOUZA, F.P.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E.A. Epidemiologia da verminose em ovinos na Região de Guarapuava - Paraná. In: EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 7.,1999, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 1999. v.2. p. 494.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T.; SEQUEIRA, J.L. Parasitological characteristics and tissue response in the abomasum of sheep infected with *Haemonchus* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n.5, p.447-452, 2000.

- PERNTHANER, A.; STANKIEWICZ, M.; BISSET, S.A.; JONAS, W.E.; CABAJ, W.; PULFORD, H.D. The immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes: lymphocyte blastogenic activity, eosinophilia and total white blood cell counts. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 523-529, 1995.
- PFEFFER, A.; DOUCH, P.G.C.; SHAW, R.J.; GATEHOUSE, T.K.; RABEL, B.; GREEN, R.S.; SHIRER, C.L.; JONAS, W.E.; BISSET, S. Sequential cellular and humoral responses in the abomasal mucosa and blood of sheep dosed with *Trichostrongylus axei*. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 7, p. 765-773, 1996.
- PRESTON, J.M.; ALLONBY, E.W. The influence of breed on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infection in Kenya. **Research in Veterinary Science**, v. 26, p. 134-139, 1979.
- RADHAKRISHNAN, C.V.; BRADLEY, R.E.; LOGGINS, P.E. Host response of worm-free Florida Native and Rambouillet lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 817-823, 1972.
- RIFFKIN, G.G.; DOBSON, C. Predicting resistance of sheep to *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 5, p. 365-378, 1979.
- ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 1, p. 99, 1950.
- ROBERTS, F.H.S.; SWAN, R.A. Quantitative studies on ovine haemonchosis. I Relationship between faecal egg counts and total worm counts. **Veterinary Parasitology**, v. 8, p. 165-171, 1981.
- ROIT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. Tradução: Ida Gubert. São Paulo: Editora Manole, 1999. 423 p. Tradução de: Immunology.
- ROTHWELL, T.L.W.; DINEEN, J.K. Cellular reactions in guinea-pigs following primary and challenge infection with *Trichostrongylus colubriformis* with special reference to the roles of eosinophils and basophils in rejection of the parasite. **Immunology**, v. 22, p. 733-745, 1972.
- RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A.P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes – Modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 5-8, 1954.
- SALISBURY, G.W.; VanDEMARK, N.L.; LODGE, J.R. **Fisiología de la Reproducción e inseminación artificial de los bóvidos**. 2.ed. Tradução: José Maria Tarazona Vilas. Zaragoza: Editorial Acribia, 1978. 831 p. Tradução de: Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SANTIAGO, M.A.M.; BEVENGA, S.F.; COSTA, U.C. Epidemiologia e controle da helmintose ovina no Município de Itaquí, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, v.11, p. 1-7, 1976.
- SCHALLIG, H.D.F.H.; HORNOK, S.; CORNELISSEN, J.B.W.J. Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Haemonchus contortus* infections in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.57, p. 329-338, 1995.

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. **Veterinary Hematology**. 3 ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 90-149.

SCHMIDT, E.M.S. **Estudo de marcadores parasitológicos e hematológicos de resistência ao parasitismo gastrointestinal em ovinos**. Curitiba, 2000. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Abril de 2000. 102 p.

SCHMIDT, E.M.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MORAES, F.R. Pesquisa de marcadores parasitológicos e hematológicos de resistência ao parasitismo gastrointestinal em cordeiros. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, v. 4, n. 1, p. 55-64, 2001.

SEAB. Departamento de Economia Rural. **Rebanho pecuário – Paraná – Evolução anual das diferentes espécies animais (1990–2001)**. Disponível em: [www.pr.gov.br/seab](http://www.pr.gov.br/seab). Acesso em: 07 ago. 2001.

SHAW, R.J.; GRIMMETT, D.J.; DONAGHY, M.J.; GATEHOUSE, T.K.; SHIRER, C.L.; DOUCH, P.G.C. Production and characterisation of monoclonal antibodies recognising ovine IgE. **Veterinary immunology and Immunopathology**, v. 51, n. 3-4, p. 235-251, 1996.

SHAW, R.J.; McNEILL, M.M.; GATEHOUSE, T.K.; DOUCH, P.G.C. Quantification of total sheep IgE concentration using anti-ovine IgE monoclonal antibodies in an enzyme immunoassay. **Veterinary immunology and Immunopathology**, v.57, p.253-265, 1997

SHAW, R.J.; GATEHOUSE, T.K.; McNEILL, M.M. Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p. 293-302, 1998

SHAW, R.J.; MORRIS, C.A.; GREEN, R.S.; WHEELER, M.; BISSET, S.A.; VLASSOFF, A.; DOUCH, P.G.C. Genetic and phenotypic relationships among *Trichostrongylus colubriformis* – specific immunoglobulin E, anti – *Trichostrongylus colubriformis* antibody, immunoglobulin G<sub>1</sub>, faecal egg count and body weight traits in grazing Romney lambs. **Livestock Production Science**, v. 58, p.25-32, 1999

SLOSS, M.W.; ZAJAC, A.M.; KEMP, R.L. **Parasitologia Clínica Veterinária**. Tradução: Renata Diniz; Cláudia Regina Pedigone. 6.ed. São Paulo: Editora Manole Ltda., 1999. 198 p. Original: Veterinary Clinical Parasitology - Sixth Edition.

SOTOMAIOR, C. **Estudo de caracteres que possam auxiliar na identificação de ovinos resistentes e susceptíveis às helmintoses gastrointestinais**. Curitiba, 1997. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

SOUZA, F. **Contribuição para o estudo da resistência dos helmintos gastrointestinais de ovinos (*Ovis aires*) aos anti-helmínticos no Estado do Paraná**. Curitiba, Julho de 1997. Universidade Federal do Paraná. Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre–Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 74 p.

SRÉTER, T.; KASSAI, T.; TAKÁCS, E. The heritability and specificity of responsiveness to infection with *Haemonchus contortus* in sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 6, p. 871-876, 1994.

STEAR, M.J.; BISHOP, S.C.; DUNCAN, J.L.; McKELLAR, Q.A.; MURRAY, M. The repeatability of faecal egg counts, peripheral eosinophil counts, and plasma pepsinogen concentrations during deliberate infections with *Ostertagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 375-380, 1995a.

STEAR, M.J.; BISHOP, S.C.; DOLIGALSKA, M.; DUNCAN, J.L.; HOLMES, P.H.; IRVINE, J.; McCRIE, L.; McKELLAR, Q.A.; SINSKI, E. MURRAY, M. Regulation of egg production, worm burden, worm length and worm fecundity by host immune responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 643-652, 1995b.

STEWART, D.F. Studies on resistance of sheep to infestation with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus ssp.* and on the immunological reactions of sheep exposed to infestation. IV. The antibody response to natural infestation in grazing sheep and the "self-cure" phenomenon. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 427-439, 1950 b.

\_\_\_\_\_. Studies on resistance of sheep to infestation with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus ssp.* and on the immunological reactions of sheep exposed to infestation. V. The nature of the self-cure phenomenon. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 100-117, 1953.

STOLL, N.R. Studies with the strongyloid nematode, *Haemonchus contortus*. I Acquired resistance of hosts under natural reinfection conditions out-of-doors. **Am. J. Hyg.**, v. 10, p. 384-418, 1929.

SUTHERLAND, I.A.; LEATHWICK, D.M.; GREEN, R.; BROWN, A.E.; MILLER, C.M. The effect of continuous drug exposure on the immune response to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 80, p.261-271, 1999.

SYKES, A.R. The effect of subclinical parasitism in sheep. **The Veterinary Record**, v.102, n. 2, p.32-34, 1978

THOMAS, R.J.; ALI, D.A. The effect of *Haemonchus contortus* infection on the pregnant and lactating ewe. **International Journal for Parasitology**, v. 13, n. 4, p. 393-398, 1983.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F.P.; CASTRO, E.A.; PESSÔA SILVA, M.C.; MILCZEWSKI, V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Veterinary Record**, v. 139, p. 421-422, 1996.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução**. Tradução: Paulo Marcos Agria de Oliveira. 5.ed. São Paulo: Roca, 1998. 545 p. Original: Veterinary Immunology: an Introduction.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3.ed. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1994.166p.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. Tradução: Ana Maria Nogueira Pinto Quintanilha. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1990. 306 p. Original: Veterinary Parasitology.

WAKELIN, D. Genetic control of susceptibility and resistance to parasite infection. **Advances in Parasitology**, v. 16, p. 219-246, 1978.

\_\_\_\_\_. **Immunity to Parasites – How parasitic infections are controlled**. 2<sup>nd</sup> Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 204p.

WALLER, P.J. The development of anthelmintic resistance in ruminant livestock. **Acta Tropica**, v. 56, p. 233-243, 1994.

WANG, S.; FOOTE, W.C.; BUNCH, T.D. Evolutionary implications of haemoglobin polymorphism in domesticated and wild sheep. **Small Ruminant Research**, v. 4, p. 315-322, 1991.

WHITLOCK, J.H.; MADSEN, H. The inheritance of resistance to trichostrongylidosis in sheep. II. Observations on the genetic mechanism in trichostrongylidosis. **Cornell Veterinarian**, v.48, p.134-145, 1958.

WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia**, v. 8, p. 375-376, 1927.

WINDON, R.G.; DINEEN, J.K.; KELLY, J.D. The segregation of lambs into "responders" and "non-responders": response to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae before weaning. **International Journal for Parasitology**, v. 10, n. 1, p. 65-73, 1980.

WINTER, M.D.; WRIGHT, C.; LEE, D.L. The mast cell and eosinophil response of young lambs to a primary infection with *Nematodirus battus*. **Parasitology**, v. 14, n.2, p.189-193, 1997.

WOOLASTON, R.R.; BARGER, I.A.; PIPER, L.R. Response to helminth infection of sheep selected for resistance to *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 8, p. 1015-1018, 1990.

WOOLASTON, R.R. Selection of Merino sheep for increased and decreased resistance to *Haemonchus contortus*: peri-parturient effects on faecal egg counts. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 7, p. 947-953, 1992.

WOOLASTON, R.R.; MANUELLI, P.; EADY, S.J.; BARGER, I.A.; LeJAMBRE, L.F.; BANKS, D.J.D.; WINDON, R.G. The value of circulating eosinophil count as selection criterion for resistance of sheep to Trichostrongyle parasites. **International Journal for Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 1, p. 123-126, 1996.

YAZWINSKI, T.A.; GOODE, L.; MONCOL, D.J.; MORGAN, G.W.; LINNERUD, A.C. *Haemonchus contortus* resistance in straightbred and crossbred Barbados Blackbelly sheep. **Journal of Animal Science**, v.51, n. 2, p.279-284, 1980.

## APÊNDICE I – PRINCIPAIS MARCADORES CELULARES DE LINFÓCITOS

Continua

MARCADOR; Estrutura molecular	Expressão celular	Função conhecida ou postulada
<b>CD3</b> 3 cadeias ( $\gamma, \delta, \epsilon$ )	Células T	Associada ao TCR $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ . Transdução de sinal em resultado do reconhecimento do antígeno pela célula T.  Como não é expresso em outras linhagens de leucócitos, o CD3 é o único marcador capaz de identificar todas as células T maduras.
<b>CD4</b> Polipeptídeo de 55 kDa (ovino); 50 kDa (bovino)	Células T restritas ao MHC de classe II	Molécula de adesão (liga-se à classe II do MHC); transdução de sinais  Células CD4 <sup>+</sup> consistem em 25 a 35% das células mononucleares do sangue periférico (PBM).
<b>CD5</b> Heterodímero (cadeias $\alpha\beta$ ) e, em menor quantidade, homodímero ( $\alpha\alpha$ ) Cadeia $\alpha$ de 36 ou 38 kDa; Cadeia $\beta$ de 33 ou 34 kDa (ovinos e bovinos, respectivamente)	Células T restritas ao MHC de classe I	Molécula de adesão (liga-se à classe II do MHC); transdução de sinais.  Células CD8 <sup>+</sup> consistem em 15 a 25% das PBM
<b>WC1 (T19)</b> Polipeptídeo de 215 kDa	Células T $\gamma\delta$ maduras, que não expressam CD2, CD4 ou CD8	Molécula restrita a ruminantes e suínos.  Função ainda não determinada. As células WC1 <sup>+</sup> apresentam CD45RO, indicando memória imunológica. Constituem média de 27% das PBM em bezerros (valores individuais de até 50%) e 5% das PBM em animais adultos.
<b>CD2</b> 50-60 kDa (bovinos); 50-55 kDa (ovinos)	Maior parte dos timócitos e células T $\alpha\beta$ ; Alguns macrófagos em ovinos	Molécula de adesão intercelular, envolvida na ativação e diferenciação de células T  Expressa em menores níveis nas células T de ovinos do que de bovinos.



Conclusão		
<b>MARCADOR; Estrutura molecular</b>	<b>Expressão celular</b>	<b>Função conhecida ou postulada</b>
<b>CD5</b> Proteína de 67 kDa (variação de 60-65 kDa em ovinos)	Células T, timócitos maduros; subpopulação de células B Expressão fraca em timócitos imaturos	Ligante para CD72, presente nas células B, possibilitando interações entre células T e B; molécula de adesão
<b>CD45</b> Grupo de proteínas de alto peso molecular, variando de acordo com a incorporação e reagrupamento dos éxons 4, 5 e/ou 6 do gene CD45	leucócitos	Antígeno leucocitário comum. Papel na transdução de sinais
<b>CD45R</b> Isoformas de CD45 de expressão celular restrita, diferindo de acordo com a incorporação dos éxons 4, 5 ou 6	CD45RO: células de memória; CD45RA: células T virgens; CD45RB: células B, subpopulação de células T	Papel na transdução de sinais

FONTE: HOWARD & MORRISON, 1994, p.1-12; ABBAS, LITCHMAN & POBER, 2000, p.475

## APÊNDICE II - PRINCIPAIS CITOCINAS RELEVANTES PARA A IMUNOPARASITOLOGIA

Citocina	Fonte	Funções
*IL-1	Várias células	Ativação, regulação, inflamação
IL-2	Células CD4 <sup>+</sup> , especialmente Th1; CD8 <sup>+</sup> (menor quantidade)	estímulo e proliferação de células T; produção de IFN $\gamma$ e linfotóxina; estímulo de células B (produção de anticorpos sem mudança de isótipo); estímulo de macrófagos; ativação de células NK (LAK)
IL-3	Células T	Estímulo de células B; ação como CSF para vários tipos celulares na medula óssea
IL-4	Células T CD4 <sup>+</sup> , especialmente Th2	Diferenciação de células CD4 <sup>+</sup> virgens em Th2; estímulo para células Th2 e B (produção de IgE); desenvolvimento de mastócitos, aumenta a expressão do MHC II; aumento na expressão de moléculas de adesão (VCAM-1); inibição de células Th1
IL-5	Células Th2 e mastócitos	Desenvolvimento, diferenciação e ativação de eosinófilos; estímulo para células B (produção de IgG <sub>1</sub> e, nas mucosas, IgA)
*IL-6	Várias células	Estímulo para células T, células B e granulócitos; indução de proteínas de fase aguda da inflamação
IL-9	Células T	Desenvolvimento de mastócitos
IL-10	Células T; macrófagos ativados; outras células	Inibição da produção de TNF, IL-1 e IL-2 pelos macrófagos; inibição da ativação de células T (especialmente Th1); diminuição na expressão do MHC II
*IL-12	Macrófagos	Liberação de IFN $\gamma$ por células T e NK; ativação e potencialização de células NK e CD8 <sup>+</sup> ; diferenciação de células CD4 <sup>+</sup> virgens em Th1
IL-13	Células T	Supressão da citotoxicidade em macrófagos, inibe a produção de IFN $\gamma$ e IL-12; efeito análogo à IL-4 em células não linfóides: recrutamento de eosinófilos para os tecidos, aumento na expressão de moléculas de adesão nas células vasculares
IFN $\gamma$	Células T; Células NK	Ativação de macrófagos e neutrófilos, produção de IL-12 pelos macrófagos; aumento da expressão de MHC I e II; estímulo de células B (produção de IgG <sub>2a</sub> e IgG <sub>3</sub> ; inibe troca para IgG <sub>1</sub> e IgE); produção de proteínas de fase aguda; inibição de células Th2
*TNF $\alpha$	Macrófagos (principalmente)	Inflamação; citotoxicidade; liberação de citocinas
*TNF $\beta$	Células T	Inflamação; citotoxicidade; liberação de citocinas
CSF	Várias células	Controle da produção de células mielóides na medula óssea

\* citocinas relacionadas à imunidade inata

FONTE: WAKELIN, 1996, p.22; ABBAS, LITCHMAN & POBER, 2000, p.258-282

## APÊNDICE III - SOLUÇÕES EMPREGADAS NAS ANÁLISES LABORATORIAIS

### 1 SOLUÇÕES PARA O MÉTODO DE ELISA IgG ANTI-*Haemonchus contortus*

#### 1.1 “COATING BUFFER” (tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M) – pH 9,6

- ✓ Solução A: 1,1 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada
- ✓ Solução B: 4,2 g de  $\text{NaHCO}_3$  para 1000ml de água deionizada

Acertar o pH para 9,6 adicionando solução A em B.

#### 1.2 SOLUÇÃO DE LAVAGEM

- ✓ 9 g de  $\text{NaCl}$ ;
- ✓ 500  $\mu\text{l}$  de Tween 20 (SIGMA P1379);
- ✓  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada q.s.p. 1000 ml

#### 1.3 TAMPÃO FOSFATO (PBS) 0,05 M COM 0,15 M DE $\text{NaCl}$ ; pH 7,4

- ✓ Solução A: - 8,80 g de  $\text{NaCl}$ ;
  - 7,10 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ou 17,85 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  ou 13,40 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ;
  - água deionizada q.s.p. 1000ml
- ✓ Solução B: - 1,88 g de  $\text{NaCl}$ ;
  - 1,61 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
  - água deionizada q.s.p. 200 ml
- ✓ acertar o pH adicionando a solução A em B

#### 1.4 SOLUÇÃO DE BLOQUEIO DA PLACA (CASEÍNA 2%)

- ✓ 10 g de Caseína (SIGMA C7078);
  - ✓ 250µl de Tween 20 (SIGMA P1379);
  - ✓ PBS q.s.p. 500 ml
- Alicotar em tubos de 15 ml e estocar a  $-20^{\circ}\text{C}$

#### 1.5 TAMPÃO DE INCUBAÇÃO

- ✓ 62,5 ml de Solução de Bloqueio da Placa;
  - ✓ 250 µl de Tween 20 (SIGMA P1379);
  - ✓ PBS q.s.p. 500 ml
- Alicotar em tubos de 15 e 50 ml e estocar a  $-20^{\circ}\text{C}$

#### 1.6 TAMPÃO CITRATO – pH 5,0

- ✓ 7,10 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ou 13,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ✓ 5,19 g de ácido cítrico
- ✓  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada q.s.p. 1000 ml

#### 1.6 SOLUÇÃO SUBSTRATO – OPD 2 mg

- ✓ 1 pastilha de 2 mg de orto-fenileno-diamino (OPD – SIGMA P6787)
- ✓ 2 µl de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- ✓ 10,5 ml de tampão citrato

Preparar esta solução imediatamente antes de utilizá-la. Primeiramente, o OPD deve ser acrescentado ao tampão citrato. Deixar o recipiente ao abrigo da luz enquanto o OPD dissolve. A seguir, adicionar a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , homogeneizar, e distribuir a solução na placa.

### 1.7 SOLUÇÃO DE PARADA DA REAÇÃO – ÁCIDO SULFÚRICO 5%

- ✓ 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- ✓ 19 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada

## 2 SOLUÇÕES PARA OBTENÇÃO DO ANTÍGENO

### 2.1 SOLUÇÃO MÃE DE EDTA (0,1 M)

- ✓ Diluir 3,72 g de EDTA em 100ml de água destilada.

### 2.2 SOLUÇÃO DE EDTA 1mM

- ✓ Diluir solução mãe de EDTA 1:100 em PBS pH 7,4.

## 3 SOLUÇÕES PARA DOSAGEM DE PROTEÍNA

### 3.1 REATIVO DE BRADFORD CONCENTRADO:

- ✓ 40 mg de Azul de Coomassie G250
- ✓ 20 mg de Etanol Absoluto
- ✓ 40 ml de Ácido Fosfórico 85%
- ✓  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 100 ml

Guardar em geladeira protegido da luz com papel alumínio.

Antes de utilizar: Diluir o reativo de Bradford 1: 4 volumes em H<sub>2</sub>O destilada e filtrar em papel filtro. Guardar em erlenmeyer protegido da luz. Esta mistura permanece estável por 2 dias.

### 3.4 SOLUÇÃO MÃE DE ALBUMINA BOVINA (BSA) PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO

- ✓ 100 mg de BSA em balão volumétrico de 100 ml
- ✓ 1 a 2 gotas de hidróxido de sódio diluído
- ✓ Água destilada q.s.p. 100 ml

Esta solução contém 1 mg de albumina por ml. Deve ser diluída 1:5 volumes em água destilada antes de utilizar. Diluição final: 0,2 mg/ml (200µg/ml)

## 4 SOLUÇÕES PARA TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS

### 4.1 SOLUÇÃO SATURADA DE CLORETO DE SÓDIO

- ✓ 350 g de Cloreto de sódio
- ✓ 1000 ml de água destilada
- filtrar em papel ou algodão

## **5 SOLUÇÕES PARA TÉCNICAS HEMATOLÓGICAS**

### **5.1 DILUIDOR DE PILOT MODIFICADO (MacFARLANE & CECIL, 1951)**

- ✓ 10 ml de eosina 1%
- ✓ 50 ml de Propilenoglicol
- ✓ 1 ml de Carbonato de sódio a 10%
- ✓ 40 ml de água destilada

# ANEXOS



# ANEXO I – CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DO ANTÍGENO SOMÁTICO DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* (H.c.) PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976, p.248-254)

## 1 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA PARA 10 µl DE ANTÍGENO

Média da DO das duplicatas (TABELA1):  $(0,081+0,062)/2 = 0,0715$

Equação da curva padrão (GRÁFICO 1):  $y = 0,0088x + 0,0238$

Se substituir o valor de y pela média das DO da amostra de antígeno, a concentração protéica será:

$$0,0715 = 0,0088x + 0,0238$$

$$0,0088x = 0,0477$$

$$x = 5,42 \text{ µg (em 10 µl de antígeno)}$$

Se 10 µl de antígeno tem 5,42 µg de proteína, 1 ml terá:

$$5,42 \text{ µg} \text{ ----- } 10 \text{ µl}$$

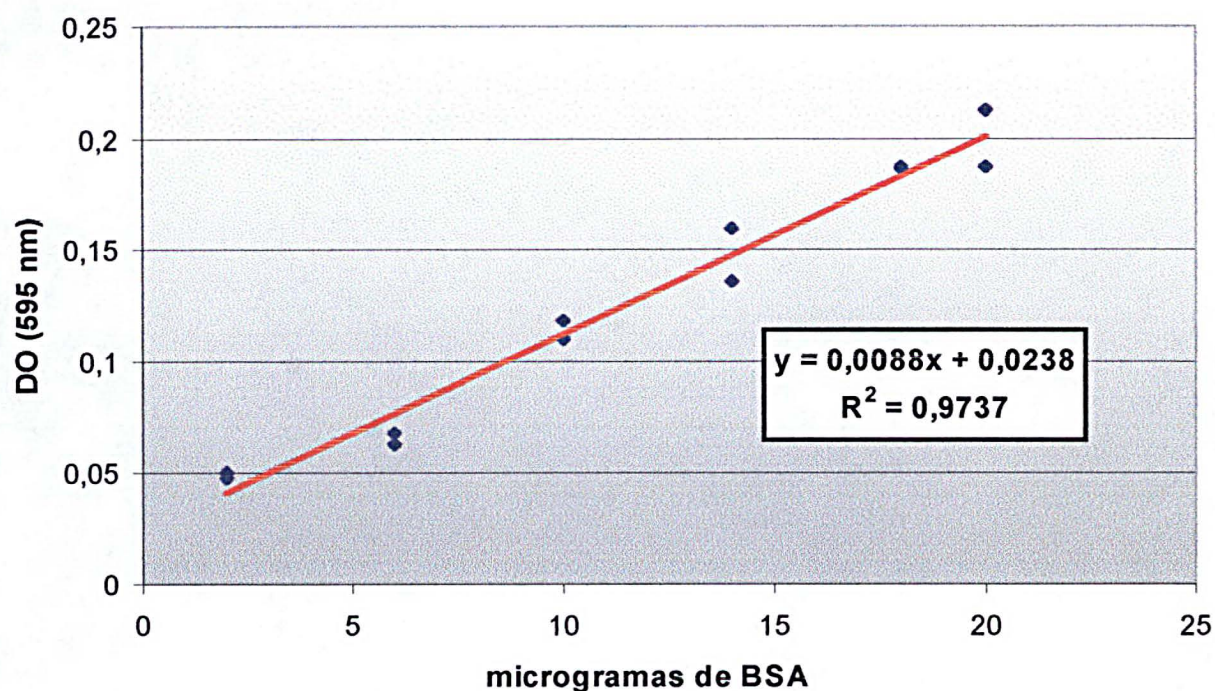
$$z \text{ ----- } 1000 \text{ µl}$$

$$z = 542 \text{ µg em } 1000\text{µl} = 0,542 \text{ mg/ml}$$

TABELA 1 – QUANTIDADES DE REATIVOS, SOLUÇÃO PADRÃO DE ALBUMINA E AMOSTRA DE ANTÍGENO SOMÁTICO DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* (H.c.) ACRESCENTADAS POR TUBO E OS RESPECTIVOS VALORES DE DENSIDADE ÓPTICA OBTIDOS PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976, p.248-254)

TUBO	PADRÃO (μl) (0,2 mg/ml)	AMOSTRA	H <sub>2</sub> O (μl)	REAGENTE DE BRADFORD (ml)	DENSIDADE ÓPTICA
1 (2 μg padrão)	10	-	90	1	0,050
2 (2 μg padrão)	10	-	90	1	0,048
3 (6 μg padrão)	30	-	70	1	0,063
4 (6 μg padrão)	30	-	70	1	0,068
5 (10 μg padrão)	50	-	50	1	0,110
6 (10 μg padrão)	50	-	50	1	0,118
7 (14 μg padrão)	70	-	30	1	0,159
8 (14 μg padrão)	70	-	30	1	0,136
9 (18 μg padrão)	90	-	10	1	0,187
10 (18 μg padrão)	90	-	10	1	0,186
11 (20 μg padrão)	100	-	0	1	0,212
12 (20 μg padrão)	100	-	0	1	0,197
13 10 μl antígeno H.c.	-	10	90	1	0,081
14 10 μl antígeno H.c.	-	10	90	1	0,062
15 50 μl antígeno H.c.	-	50	50	1	0,240
16 50 μl antígeno H.c.	-	50	50	1	0,248
17 Branco	-	-	100	1	-

GRÁFICO 1 – CURVA PADRÃO DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) OBTIDA PARA O MÉTODO DE BRADFORD (1976, p.248-254)



## 2 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA PARA 50 µl DE ANTÍGENO

Média da DO das duplicatas (TABELA1):  $(0,240+0,248)/2 = 0,244$

Equação da curva padrão (GRÁFICO1):  $y = 0,0088x + 0,0238$

Se substituir o valor de y pela média das DO da amostra de antígeno, a concentração protéica será:

$$0,244 = 0,0088x + 0,0238$$

$$0,0088x = 0,2202$$

$$x = 25,023 \text{ µg (em 50 µl de antígeno)}$$

Se 50 µl de antígeno tem 25,023 µg de proteína, 1 ml terá:

$$25,023 \text{ µg} \text{ ----- } 50 \text{ µl}$$

$$z \text{ ----- } 1000 \text{ µl}$$

$$z = 500,46 \text{ µg em } 1000\text{µl} = 0,500 \text{ mg/ml}$$

## 3 MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DO ANTÍGENO

$$\text{Conc} = (0,542 + 0,500)/2$$

$$\text{Conc} = 0,521 \text{ mg/ml}^*$$

---

\* \*Para o cálculo da solução de antígeno para sensibilização das placas, este valor foi arredondado para 0,5 mgml<sup>-1</sup>.

## ANEXO II

### CONFEÇÃO DA CURVA LOG-LOG PARA CÁLCULO DA IgE TOTAL NAS AMOSTRAS DA PLACA 01

Valores de DO obtidos para cada diluição do soro controle, em duplicata

Dil. Soro controle	1/125	1/250	1/500	1/1000	1/2000	Branco	Branco
Unidades/ml	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0	0
	0,614	0,335	0,199	0,117	0,080	0,045	0,043
	0,598	0,394	0,199	0,118	0,080	0,044	0,043

Média das duplicatas

Unidades/ml	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0	0
	0,606	0,365	0,199	0,118	0,080	0,045	0,043

Média dos brancos

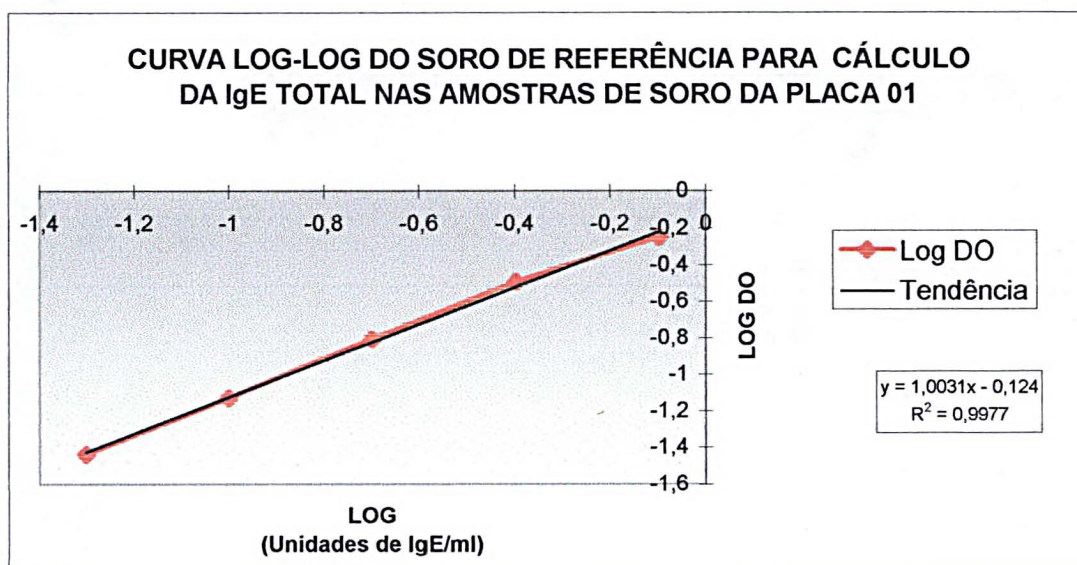
0,044

Log (valor da duplicata menos a média dos brancos)

Unidades/ml	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05
	-0,2501	-0,4938	-0,8090	-1,1322	-1,4407

Dados para a curva de referência

IgE Unidades/ml	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05
Log Unidades/ml	-0,0969	-0,3979	-0,699	-1	-1,30103
Log DO	-0,2501	-0,4938	-0,809	-1,1322	-1,44069



## ANEXO III

**RESULTADOS DO TESTE DE DUNCAN PARA A VARIÁVEL OPG,  
CONSIDERANDO APENAS O PERÍODO DE ACOMPANHAMENTO  
INDIVIDUAL DOS ANIMAIS**

TABELA 1 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE OPG E LOG (OPG+1) DAS OVELHAS PARA AS  
COLETAS INDIVIDUAIS, REALIZADAS DE NOVEMBRO DE 1998 A MAIO DE  
1999

COLETA	DATA	MÉDIA OPG	DESVIO OPG	MÉDIA LOG (OPG+1) <sup>(1)</sup>	DESVIO LOG (OPG+1)
1	10/11/98	0,000	0,00	0,000 a	0,000
2	08/12/98	20,000	41,039	0,400 ab	0,823
3	05/01/99	225,000	531,012	0,976 bcd	1,270
4	02/02/99	155,000	225,890	1,268 cd	1,207
5	02/03/99	180,000	285,804	1,666 de	1,026
6	30/03/99	2085,000	3660,065	2,131 e	1,439
7	27/04/99	35,000	48,936	0,701 abc	0,981
8	25/05/99	165,000	381,514	1,122 bcd	1,191

(1) agrupadas pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$

TABELA 2 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE OPG E LOG (OPG+1) DOS CORDEIROS PARA  
AS COLETAS INDIVIDUAIS, REALIZADAS DE OUTUBRO DE 1998 A JUNHO  
DE 1999

COLETA	DATA	MÉDIA OPG	DESVIO OPG	MÉDIA LOG (OPG+1) <sup>(1)</sup>	DESVIO LOG (OPG+1)
1	06/10/98	788,000	1350,716	1,949 cd	1,325
2	23/10/98	152,000	341,711	1,052 ab	1,168
3	03/11/98	579,167	1907,190	1,415 bc	1,301
4	17/11/98	2256,000	3575,272	2,601 def	1,180
5	01/12/98	2152,000	2153,122	3,035 fg	0,582
6	15/12/98	529,167	1233,404	1,751 cd	1,148
7	29/12/98	691,667	1356,439	4,855 cde	2,267
8	12/01/99	1141,667	1058,266	6,456 ef	1,625
9	26/01/99	3096,000	2055,172	7,742 g	0,909
10	09/02/99	3462,500	2051,259	7,949 g	0,705
11	23/02/99	490,000	1618,255	3,807 bc	2,631
12	09/03/99	48,000	65,320	1,901 a	2,383
13	06/04/99	3108,000	2479,402	7,509 fg	1,281
14	04/05/99	4648,000	6260,133	7,144 fg	2,570
15	01/06/99	240,000	261,406	4,777 cd	1,638

(1) agrupadas pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$

## ANEXO VI

TESTE T SOBRE OS GRUPOS DE OVELHAS RESISTENTES (1) E  
SUSCEPTÍVEIS (2) ÀS PARASITOSES

\* indica diferença para  $p < 0,05$



STAT. BASIC STATS	Grouping: GRUPO (ovelhas log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
OPG1	0,00000	0,00000	--	18	--	16
OPG2	,12527*	1,50324*	-4,01663*	18*	,000809*	16*
OPG3	,50108*	2,87604*	-5,07694*	18*	,000079*	16*
OPG4	1,11272	1,88747	-1,15881	18	,261676	16
OPG5	1,57024	2,04900	-,82745	18	,418818	16
OPG6	1,67422*	3,95812*	-3,63978*	18*	,001874*	16*
OPG7	,50108	1,50324	-1,95959	18	,065715*	16
OPG8	,89557	2,02809	-1,79850	18	,088890*	16
EOSINO1	2,81264	2,60939	1,17972	18	,253467	16
EOSINO2	2,71430	2,58496	,83171	18	,416468	16
EOSINO3	2,77228	2,53674	1,27858	18	,217284	16
EOSINO4	2,75401	2,53502	1,76452	18	,094606*	16
EOSINO5	2,71389*	2,50112*	2,12277*	18*	,047900*	16*
EOSINO6	2,64345*	2,28093*	4,55913*	18*	,000243*	16*
EOSINO7	2,69810	2,63189	,65296	18	,522036	16
EOSINO8	2,44782	2,43680	,10029	18	,921226	16
IGE1	-,65478	-,86548	,58914	18	,563090	16
IGE2	-1,02634	-1,22843	,42557	15	,676465	14
IGE3	-,73048	-,89335	,50619	18	,618864	16
IGE4	-,37384	-,71151	1,15780	18	,262080	16
IGE5	-,50474	-,56604	,19576	18	,846993	16
IGE6	-,43353	-,73526	,97743	18	,341311	16
IGE7	-,40319	-,52626	,43180	18	,671013	16
IGE8	-,55588	-,85175	,94101	18	,359160	16
T_IGE5	1,69763	1,41165	1,17780	17	,255103	15
IGG1	-,40086	-,39055	-,19187	18	,849995	16
IGG2	-,29222	-,41046	1,31921	18	,203634	16
IGG3	-,34751	-,24496	-1,13150	18	,272693	16
IGG4	-,29293	-,24747	-,63835	18	,531284	16
IGG5	-,30047	-,25516	-,80555	18	,431018	16
IGG6	-,32193	-,26390	-,93511	18	,362106	16
IGG7	-,34128	-,32524	-,35865	18	,724029	16
IGG8	-,50316	-,50164	-,02381	18	,981264	16

STAT. BASIC STATS	Grouping: GRUPO (ovelhas log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
OPG1	4	0,000000	0,000000	--	--
OPG2	4*	,501080*	1,002161*	4,0000*	,056274*
OPG3	4*	,896360*	,429263*	4,3603*	,250982*
OPG4	4	1,171671	1,310773	1,2515	,652642
OPG5	4	,947205	1,393415	2,1641	,269692
OPG6	4*	1,229406*	,050132*	601,3915*	,000196*
OPG7	4	,896360	1,002161	1,2500	,653645
OPG8	4	1,051215	1,444988	1,8895	,349484
EOSINO1	4	,304601	,325609	1,1427	,727722
EOSINO2	4	,252896	,380095	2,2589	,246970
EOSINO3	4	,340866	,265835	1,6442	,760193
EOSINO4	4	,198955	,312725	2,4707	,203486
EOSINO5	4*	,192348*	,088928*	4,6784*	,229375*
EOSINO6	4*	,153632*	,058158*	6,9784*	,135247*
EOSINO7	4	,195635	,077570	6,3608	,153215
EOSINO8	4	,201969	,166466	1,4720	,843625
IGE1	4	,662206	,513181	1,6651	,750923
IGE2	3	,764699	,614405	1,5491	,919224
IGE3	4	,581695	,543795	1,1442	1,000000
IGE4	4	,540590	,414653	1,6997	,736024
IGE5	4	,592028	,360791	2,6926	,450375

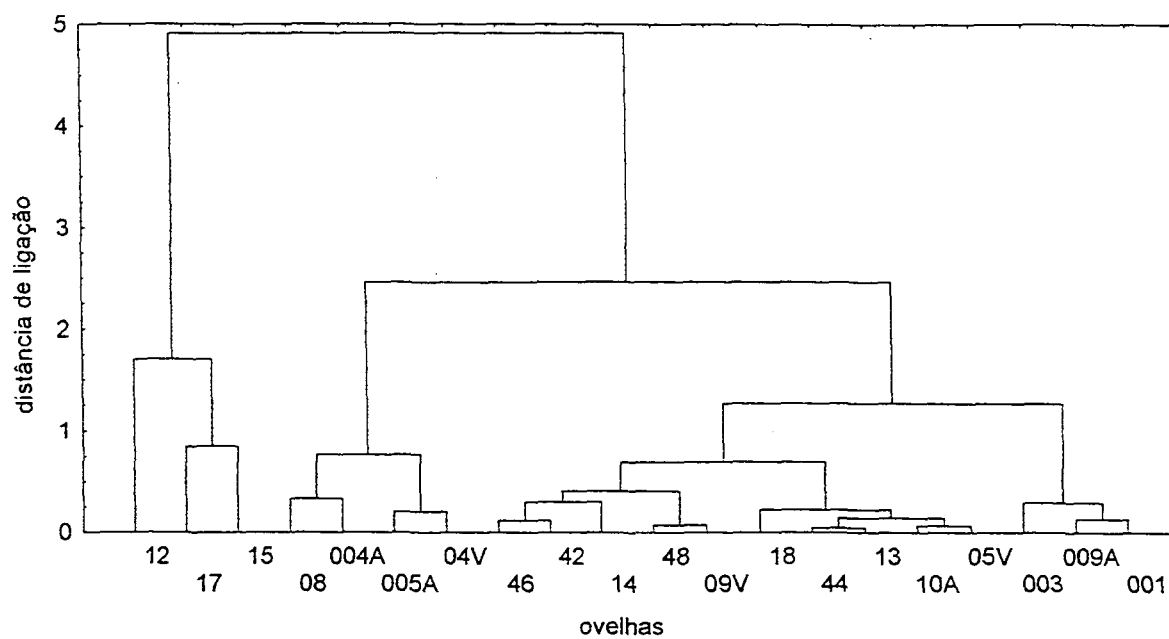
STAT. BASIC STATS	Grouping: GRUPO (ovelhas log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
IGE6	4	,550875	,558897	1,0293	,815364
IGE7	4	,523673	,434285	1,4540	,853179
IGE8	4	,597346	,337662	3,1296	,377749
T_IGE5	4	,436566	,406934	1,1509	1,000000
IGG1	4	,098001	,086123	1,2949	,945321
IGG2	4	,125431	,274887	4,8028	,030806
IGG3	4	,173364	,086212	4,0437	,276055
IGG4	4	,137325	,055681	6,0825	,162649
IGG5	4	,109760	,022474	23,8511	,023798
IGG6	4	,120929	,028528	17,9686	,035868
IGG7	4	,086903	,025652	11,4773	,067969
IGG8	4	,120678	,071361	2,8598	,420081



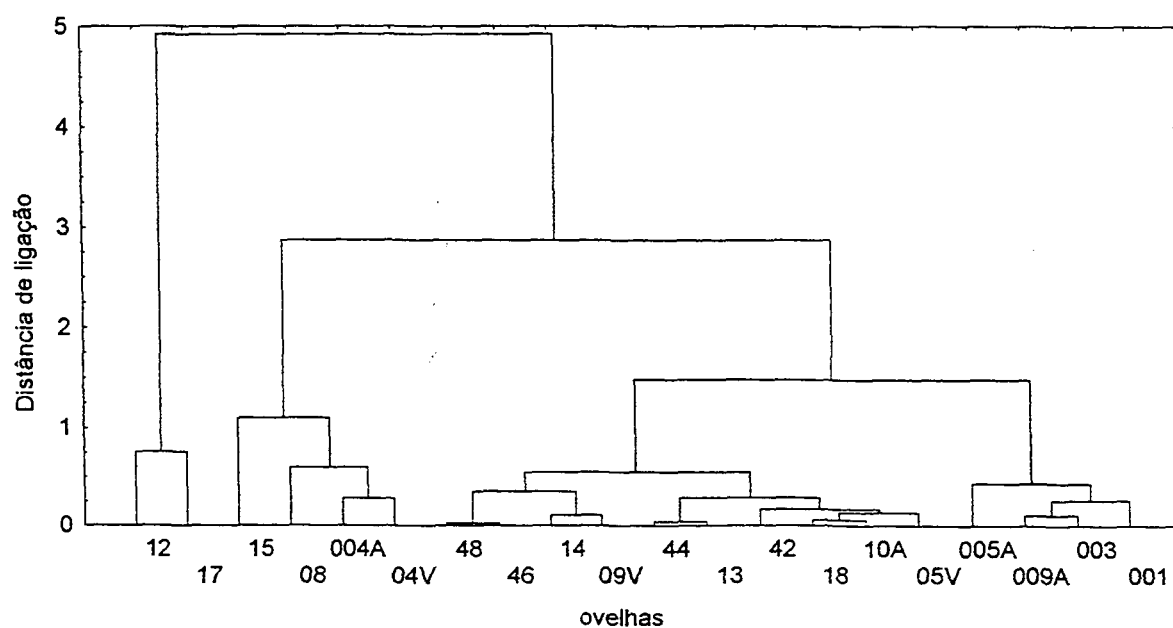
## ANEXO V

### HIPÓTESES PARA SELEÇÃO INDIRETA DAS OVELHAS EM RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS À PARASITOSE GASTRINTESTINAL

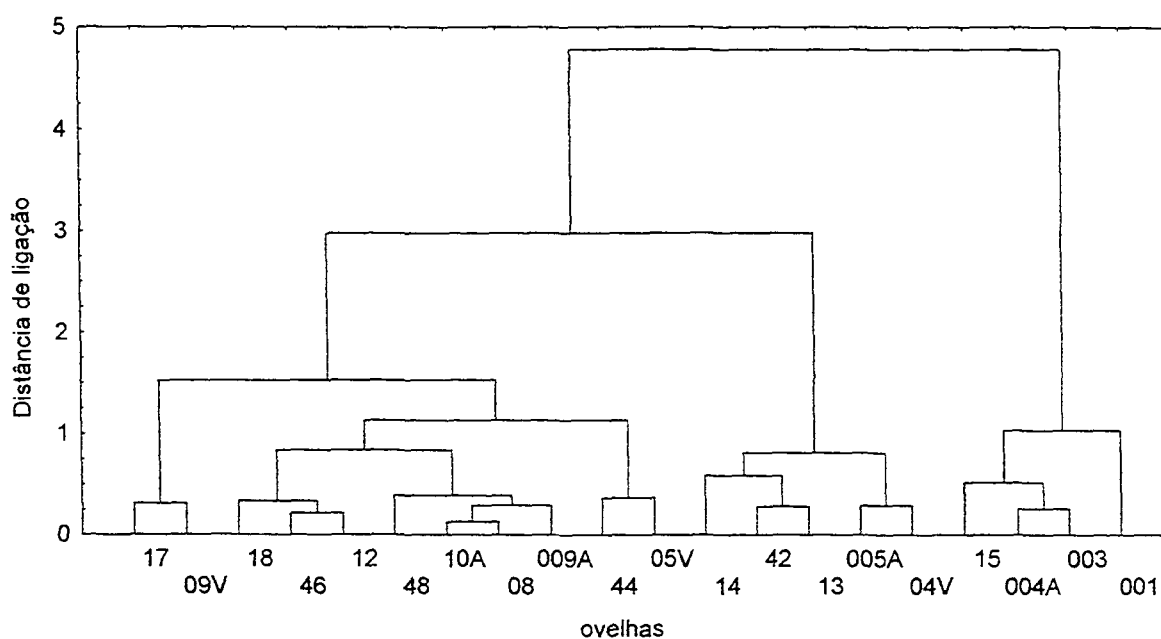
Hipótese de seleção indireta para resistência à parasitose gastrointestinal  
por meio da IgE anti - *Haemonchus contortus*  
Agrupamento: dados de IgE das coletas 6 e 7



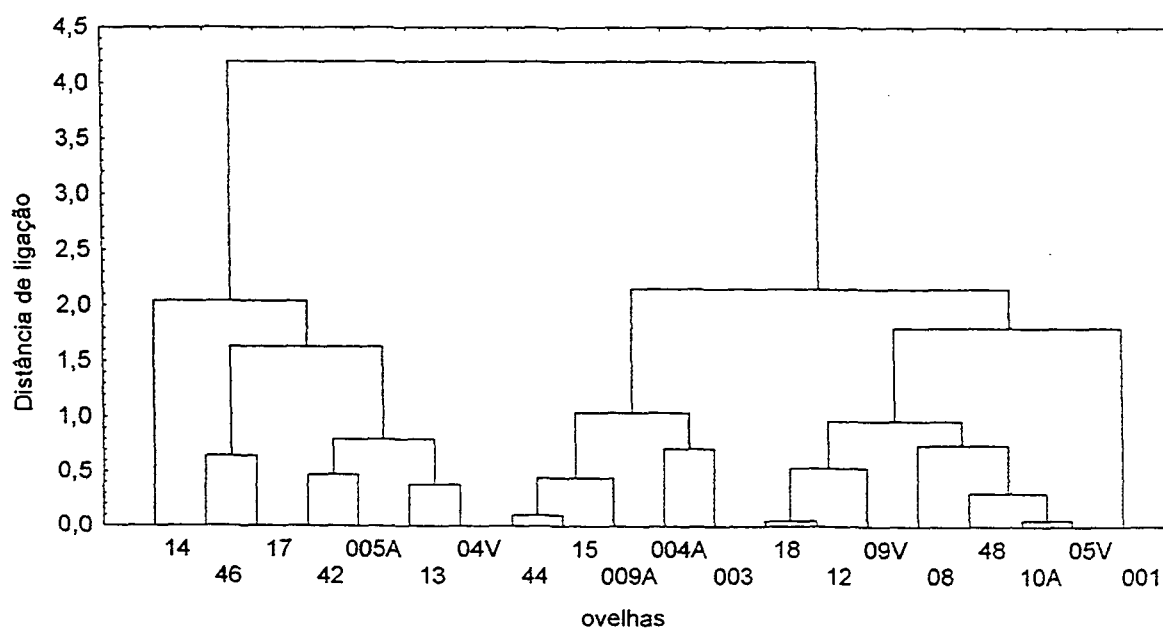
Hipótese de seleção indireta para resistência à parasitose gastrointestinal  
por meio da IgE anti - *Haemonchus contortus*  
Agrupamento: dados de IgE das coletas 5 e 6



Hipótese de seleção indireta para resistência à parasitose gastrintestinal  
por meio da IgG anti - *Haemonchus contortus*  
Agrupamento: Dados de IgG das coletas 5 e 6



Hipótese de seleção indireta para resistência à parasitose gastrintestinal  
por meio da IgG anti - *Haemonchus contortus*  
Agrupamento: dados de IgG das coletas 6 e 7



## ANEXO VI

TESTE T SOBRE OS GRUPOS DE CORDEIROS RESISTENTES (1)  
E SUSCEPTÍVEIS (2) ÀS PARASITOSES

As análises foram realizadas conforme três hipóteses de agrupamento:

- ✓ H1: análise de *cluster* sobre os dados de opg da coleta 5 (01/12/98), quando os cordeiros tinham média de idade de cinco meses;
- ✓ H2: análise de *cluster* sobre os dados de opg da coleta 10 (09/02/99), quando os cordeiros tinham média de idade de sete meses e meio;
- ✓ H3: análise de *cluster* sobre os dados de opg da coleta 14 (04/05/99), quando os cordeiros tinham média de idade de dez meses.

\* indica diferença para  $p < 0,05$

STAT. BASIC STATS	Grouping: H1: Log10(V1) (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
OPG_1	1,273966*	2,682121*	-3,08985*	23*	,005170*	13*
OPG_2	,748066	1,382912	-1,38265	23	,180052	13
OPG_3	,616714*	2,358752*	-4,36759*	22*	,000246*	13*
OPG_4	2,033263*	3,216669*	-2,85350*	23*	,008990*	13*
OPG_5	2,551921*	3,559982*	-9,03029*	23*	,000000*	13*
OPG_6	1,386027	2,117831	-1,61445	22	,120683	12
OPG_7	4,269461	5,441438	-1,28399	22	,212505	12
OPG_8	6,177473	6,735498	-,83550	22	,412418	12
OPG_9	7,436981	8,072584	-1,83005	23	,080233	13
OPG_10	7,791777	8,106298	-1,09619	22	,284850	12
OPG_11	3,107831	4,566449	-1,41329	23	,170962	13
OPG_12	1,472974	2,364909	-,93243	23	,360802	13
OPG_13	7,334405	7,698558	-,70249	23	,489421	13
OPG_14	6,797788	7,519258	-,69360	23	,494882	13
OPG_15	4,753607	4,803885	-,07506	23	,940820	13

STAT. BASIC STATS	Grouping: H1: Log10(V1) (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
OPG_1	12*	1,256123*	,994270*	1,596083*	,447017*
OPG_2	12	,987850	1,298491	1,727809	,361152
OPG_3	11*	,962845*	,986339*	1,049398*	,923157*
OPG_4	12*	,975677*	1,097982*	1,266424*	,688872*
OPG_5	12*	,332717*	,204511*	2,646764*	,117635*
OPG_6	12	1,029581	1,185569	1,325966	,647929
OPG_7	12	2,145370	2,322722	1,172169	,796879
OPG_8	12	2,141806	,875000	5,991619	,006124
OPG_9	12	1,086560	,534707	4,129296	,025427
OPG_10	12	,794459	,597263	1,769341	,358099
OPG_11	12	2,643558	2,504777	1,113883	,865060
OPG_12	12	2,306107	2,477319	1,153998	,805515
OPG_13	12	1,418767	1,144573	1,536509	,484868
OPG_14	12	2,476751	2,724904	1,210424	,744878
OPG_15	12	1,649012	1,699510	1,062185	,913450

STAT. BASIC STATS	Grouping: H1: Log10(V1) (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
EOSINO_1	1,675124	1,611532	,59733	23	,556125	13
EOSINO_2	1,817758	1,834173	-,12981	23	,897842	13
EOSINO_3	1,775390	1,863191	-,82533	23	,417665	13
EOSINO4	1,600176	1,782379	-1,20594	23	,240101	13
EOSINO5	1,620414	1,651283	-,21738	23	,829829	13
EOSINO6	1,596143	1,733825	-1,18298	23	,248900	13
EOSINO_7	1,826072	2,023820	-1,34280	23	,192438	13
EOSINO_8	2,048459	2,014039	,19270	23	,848889	13
EOSINO9	1,669724	1,961437	-1,78324	23	,087751	13
EOSINO10	1,849617	2,062658	-1,53319	23	,138870	13
EOSINO11	2,114359	2,150166	-,28422	23	,778788	13
EOSINO12	2,118721	2,240526	-1,06619	23	,297404	13
EOSINO13	1,963929	1,884415	,66470	23	,512851	13
EOSINO14	2,200138	2,301370	-,83648	23	,411495	13
EOSINO15	2,233271	2,080898	1,04920	22	,305474	12

STAT. BASIC STATS	Grouping: H1: Log10(V1) (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
EOSINO_1	12	,321832	,186774	2,969108	,081570
EOSINO_2	12	,265534	,362917	1,867989	,297928
EOSINO_3	12	,273641	,256853	1,134997	,840711
EOSINO4	12	,379632	,374990	1,024912	,974372
EOSINO5	12	,320309	,388821	1,473542	,515004
EOSINO6	12	,215096	,355330	2,728960	,098611
EOSINO_7	12	,274761	,447885	2,657193	,107546
EOSINO_8	12	,453737	,437824	1,074013	,912705
EOSINO9	12	,429890	,384113	1,252555	,716140
EOSINO10	12	,366011	,325224	1,266549	,702521
EOSINO11	12	,298337	,331644	1,235751	,719042
EOSINO12	12	,252134	,317708	1,587790	,438791
EOSINO13	12	,258240	,337568	1,708731	,370814
EOSINO14	12	,235470	,361398	2,355604	,156541
EOSINO15	12	,371365	,339380	1,197378	,770422

STAT. BASIC STATS	Grouping: H1: Log10(V1) (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
IGE1	-1,41028	-1,56932	1,033627	19	,314289	11
IGE3	-1,30525	-1,59813	2,039479	17	,057258	9
IGE5	-1,30349*	-1,84095*	3,851678*	20*	,000995*	13*
IGE8	-1,11392*	-1,70087*	3,068703*	17*	,006955*	11*
IGE10	-1,13087	-1,43532	1,512856	21	,145221	11
IGE12	-,95964*	-1,57346*	2,412056*	18*	,026756*	12*
IGE13	-,67013*	-1,46748*	4,946841*	19*	,000090*	11*
IGE14	-,67741*	-1,30299*	3,317993*	23*	,002997*	13*
IGE15	-,65893*	-1,23228*	2,550519*	20*	,019055*	10*
TIGE1	,55109	,23867	1,716068	20	,101600	11
TIGE3	,69265	,51878	1,429020	23	,166440	13
TIGE5	1,05467*	,52896*	3,362671*	22*	,002811*	13*
TIGE8	,82465	,77345	,591755	23	,559787	13
TIGE10	,91574	,74089	1,866861	22	,075305	12
TIGE12	,95340	,73065	1,761951	22	,091969	12
TIGE13	1,02279*	,59917*	4,773708*	23*	,000082*	13*
TIGE14	,95502*	,59481*	2,583562*	23*	,016609*	13*
TIGE15	,96360*	,75207*	2,197606*	22*	,038799*	12*

STAT. BASIC STATS	Grouping: H1: Log10(V1) (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variancs	p variancs
IGE1	10	,453007	,183877	6,069516	,012177
IGE3	10	,328462	,297687	1,217448	,770272
IGE5	9*	,312281*	,335567*	1,154690*	,793484*
IGE8	8*	,489595*	,262804*	3,470650*	,112099*
IGE10	12	,536591	,426582	1,582280	,462587
IGE12	8*	,579642*	,520911*	1,238202*	,802772*
IGE13	10*	,415231*	,309383*	1,801298*	,389668*
IGE14	12*	,575068*	,320979*	3,209846*	,062857*
IGE15	12*	,566189*	,488747*	1,342007*	,635358*
TIGE1	11	,257181	,546311	4,512330	,025847
TIGE3	12	,315580	,290698	1,178510	,792447
TIGE5	11*	,254515*	,492596*	3,745870*	,034018*
TIGE8	12	,239227	,187761	1,623351	,430748
TIGE10	12	,207683	,249247	1,440317	,555265
TIGE12	12	,320037	,298943	1,146098	,825112
TIGE13	12*	,173994*	,264039*	2,302855*	,167469*
TIGE14	12*	,222831*	,446608*	4,017007*	,024332*
TIGE15	12*	,211785*	,257553*	1,478922*	,527126*

STAT. BASIC STATS	Grouping: H1: Log10(V1) (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
IGG1	-,869980	-,910530	,374441	22	,711661	12
IGG3	-,755794	-,755508	-,004026	23	,996823	13
IGG5	-,505299*	-,634846*	2,081885*	22*	,049195*	13*
IGG8	-,392585	-,474314	1,471697	23	,154654	13
IGG10	-,335767	-,376671	,675579	23	,506044	13
IGG12	-,374485	-,351035	-,385511	23	,703402	13
IGG13	-,408730	-,424269	,359481	23	,722515	13
IGG14	-,375628	-,410448	,579459	23	,567912	13
IGG15	-,345685	-,417334	1,283553	22	,212654	12

STAT. BASIC STATS	Grouping: H1: Log10(V1) (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variancs	p variancs
IGG1	12	,325316	,186826	3,032062	,079079
IGG3	12	,179074	,175610	1,039837	,955281
IGG5	11*	,149072*	,155207*	1,084005*	,881616*
IGG8	12	,093792	,175046	3,483157	,041997
IGG10	12	,144965	,157814	1,185117	,771544
IGG12	12	,149380	,154704	1,072559	,900674
IGG13	12	,105953	,110148	1,080756	,890684
IGG14	12	,131610	,167980	1,629077	,414217
IGG15	12	,142683	,130513	1,195191	,772684



STAT. BASIC STATS	Grouping: H2 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
OPG_1	1,917230	1,998856	-,14771	23	,883858	15
OPG_2	,629500*	1,687730*	-2,43552*	23*	,023033*	15*
OPG_3	1,371450	1,476326	-,19056	22	,850618	14
OPG_4	2,754585	2,371368	,78915	23	,438084	15
OPG_5	3,055856	3,005691	,20688	23	,837928	15
OPG_6	1,263111*	2,436273*	-2,81392*	22*	,010111*	14*
OPG_7	4,582390	5,310548	-,75459	22	,458498	15
OPG_8	6,215282	6,794170	-,85524	22	,401634	14
OPG_9	7,639100	7,896527	-,68595	23	,499600	15
OPG_10	7,493513*	8,586772*	-5,84595*	22*	,000007*	14*
OPG_11	2,928329*	5,127426*	-2,20603*	23*	,037642*	15*
OPG_12	1,584252	2,376379	-,80832	23	,427187	15
OPG_13	7,484418	7,546369	-,11599	23	,908670	15
OPG_14	6,336023	8,356200	-2,04973	23	,051961	15
OPG_15	4,866145	4,645133	,32422	23	,748700	15

STAT. BASIC STATS	Grouping: H2 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
OPG_1	10	1,278628	1,462619	1,308501	,628978
OPG_2	10*	1,108289*	,992000*	1,248198*	,755484*
OPG_3	10	1,283543	1,392590	1,177133	,765214
OPG_4	10	,980342	1,456298	2,206709	,178234
OPG_5	10	,518582	,695175	1,797021	,314052
OPG_6	10*	1,213117*	,593949*	4,171648*	,038032*
OPG_7	9	2,162990	2,493329	1,328771	,613051
OPG_8	10	2,005517	,850414	5,561500	,014338
OPG_9	10	,961013	,850230	1,277574	,727586
OPG_10	10*	,550122*	,248103*	4,916489*	,021990*
OPG_11	10*	2,547039*	2,268380*	1,260780*	,743406*
OPG_12	10	2,324936	2,513312	1,168614	,765832
OPG_13	10	1,143644	1,529663	1,788998	,317623
OPG_14	10	2,923088	1,266088	5,330350	,016065
OPG_15	10	1,593950	1,781253	1,248825	,684352

STAT. BASIC STATS	Grouping: H2 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
EOSINO_1	1,626108	1,672338	-,424194	23	,675366	15
EOSINO_2	1,801126	1,862405	-,477364	23	,637608	15
EOSINO_3	1,892518	1,705059	1,821565	23	,081554	15
EOSINO4	1,697465	1,672885	,154792	23	,878335	15
EOSINO5	1,748939*	1,464668*	2,148776*	23*	,042412*	15*
EOSINO6	1,686205	1,626269	,492871	23	,626776	15
EOSINO_7	1,970111	1,847311	,798230	23	,432902	15
EOSINO_8	2,118250	1,902468	1,221407	23	,234304	15
EOSINO9	1,831132	1,777668	,300972	23	,766140	15
EOSINO10	2,050135	1,804490	1,758707	23	,091927	15
EOSINO11	2,154681	2,096844	,451371	23	,655949	15
EOSINO12	2,239378	2,083902	1,353577	23	,189025	15
EOSINO13	1,951158	1,887669	,518510	23	,609055	15
EOSINO14	2,272228	2,213480	,471182	23	,641949	15
EOSINO15	2,234810	2,048268	1,281264	22	,213442	14

STAT. BASIC STATS	Grouping: H2 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variancs	p variancs
EOSINO_1	10	,267322	,266375	1,007126	1,000000
EOSINO_2	10	,322889	,300823	1,152086	,854305
EOSINO_3	10	,233057	,279106	1,434205	,525978
EOSINO4	10	,354008	,437832	1,529635	,459031
EOSINO5	10*	,330433*	,313875*	1,108290*	,903303*
EOSINO6	10	,321624	,256601	1,571012	,501213
EOSINO_7	10	,345033	,421558	1,492767	,483822
EOSINO_8	10	,473820	,359639	1,735773	,408655
EOSINO9	10	,520010	,251383	4,279105	,033967
EOSINO10	10	,356088	,319205	1,244439	,759129
EOSINO11	10	,312780	,315562	1,017866	,941818
EOSINO12	10	,317964	,212212	2,245001	,224922
EOSINO13	10	,366449	,144916	6,394326	,008369
EOSINO14	10	,328583	,265362	1,533244	,525555
EOSINO15	10	,382235	,302024	1,601684	,484225

STAT. BASIC STATS	Grouping: H2 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
IGE1	-1,46662	-1,51187	,284126	19	,779387	12
IGE3	-1,42227	-1,51046	,549069	17	,590098	11
IGE5	-1,42947	-1,65898	1,297661	20	,209172	13
IGE8	-1,35582	-1,37003	,058261	17	,954220	12
IGE10	-1,17260	-1,44196	1,312002	21	,203681	13
IGE12	-1,05043	-1,39430	1,243055	18	,229796	11
IGE13	-1,00044	-1,14859	,578612	19	,569647	14
IGE14	-,85792	-1,15734	1,328919	23	,196909	15
IGE15	-,91145	-1,04393	,515304	20	,611990	12
TIGE1	,44905	,31663	,675333	20	,507198	13
TIGE3	,63459	,57110	,492960	23	,626714	15
TIGE5	,94029	,63651	1,657228	22	,111667	14
TIGE8	,81416	,77895	,397360	23	,694766	15
TIGE10	,83481	,81922	,152562	22	,880134	14
TIGE12	,89544	,76724	,955187	22	,349862	14
TIGE13	,84876	,77549	,577942	23	,568919	15
TIGE14	,88722	,62446	1,729527	23	,097115	15
TIGE15	,91537	,77728	1,331517	22	,196652	14

STAT. BASIC STATS	Grouping: H2 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
IGE1	9	,384341	,326635	1,384546	,658417
IGE3	8	,282568	,419611	2,205194	,248205
IGE5	9	,357141	,473894	1,760684	,363550
IGE8	7	,333721	,735997	4,863884	,023200
IGE10	10	,443883	,541448	1,487905	,511793
IGE12	9	,522345	,715019	1,873789	,347821
IGE13	7	,509385	,637734	1,567425	,466476
IGE14	10	,500193	,623884	1,555723	,442267
IGE15	10	,545388	,661492	1,471088	,538101
TIGE1	9	,452987	,450999	1,008839	1,000000
TIGE3	10	,309948	,323893	1,092008	,851494
TIGE5	10	,307452	,585319	3,624353	,035630
TIGE8	10	,255473	,137332	3,460599	,066876
TIGE10	10	,183486	,316605	2,977332	,073164
TIGE12	10	,215651	,435503	4,078287	,022355
TIGE13	10	,266123	,369118	1,923822	,262913
TIGE14	10	,226076	,523847	5,369092	,005471
TIGE15	10	,245876	,256988	1,092435	,858048

STAT. BASIC STATS	Grouping: H2 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
IGG1	-,831966	-,971859	1,318908	22	,200765	14
IGG3	-,730537	-,793336	,881508	23	,387162	15
IGG5	-,541327	-,597362	,826968	22	,417135	14
IGG8	-,390711	-,493473	1,860649	23	,075627	15
IGG10	-,321287	-,406573	1,427004	23	,167014	15
IGG12	-,344651	-,391097	,755529	23	,457600	15
IGG13	-,392722	-,451389	1,381052	23	,180535	15
IGG14	-,350776	-,454689	1,797829	23	,085346	15
IGG15	-,340703	-,438639	1,785350	22	,088000	14

STAT. BASIC STATS	Grouping: H2 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variancs	p variancs
IGG1	10	,211064	,309957	2,156612	,201892
IGG3	10	,190441	,146297	1,694530	,429890
IGG5	10	,126988	,205374	2,615580	,112804
IGG8	10	,094154	,181606	3,720397	,027910
IGG10	10	,114179	,185717	2,645638	,100019
IGG12	10	,141920	,163146	1,321488	,617499
IGG13	10	,096880	,114323	1,392508	,558184
IGG14	10	,119981	,169800	2,002860	,235581
IGG15	10	,099563	,169082	2,884021	,081631

STAT. BASIC STATS	Grouping: H3 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
OPG_1	2,000320	1,885685	,21029	23	,835290	14
OPG_2	1,013704	1,102540	-,18485	23	,854968	14
OPG_3	1,172226	1,702238	-,99410	22	,330983	13
OPG_4	2,426506	2,823761	-,83006	23	,415040	14
OPG_5	2,882497	3,230891	-1,52632	23	,140567	14
OPG_6	1,256419*	2,337531*	-2,56040*	22*	,017840*	13*
OPG_7	4,289998	5,647082	-1,48296	22	,152271	14
OPG_8	6,011059	6,982898	-1,49865	22	,148178	13
OPG_9	7,546396	7,991110	-1,22688	23	,232278	14
OPG_10	7,700194	8,243126	-1,99547	22	,058521	13
OPG_11	3,858773	3,743307	,10665	23	,915990	14
OPG_12	,988954*	3,062019*	-2,35469*	23*	,027447*	14*
OPG_13	7,059125*	8,082020*	-2,12116*	23*	,044901*	14*
OPG_14	5,757811*	8,908455*	-3,80015*	23*	,000923*	14*
OPG_15	4,519782	5,106051	-,88411	23	,385788	14

STAT. BASIC STATS	Grouping: H3 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
OPG_1	11	1,182839	1,546363	1,70912	,361360
OPG_2	11	1,268623	1,086328	1,36378	,631377
OPG_3	11	1,408400	1,160101	1,47388	,547087
OPG_4	11	1,223380	1,139943	1,15175	,837256
OPG_5	11	,633671	,464951	1,85743	,331256
OPG_6	11*	1,036990*	1,023065*	1,02741*	,980008*
OPG_7	10	1,958488	2,530007	1,66879	,388683
OPG_8	11	1,968676	,928182	4,49865	,023547
OPG_9	11	,923086	,868209	1,13041	,861193
OPG_10	11	,723288	,585339	1,52689	,510572
OPG_11	11	2,819799	2,504021	1,26812	,717277
OPG_12	11*	1,965189*	2,441540*	1,54354*	,456826*
OPG_13	11*	1,334357*	,989993*	1,81669*	,348875*
OPG_14	11*	2,680575*	,630621*	18,06837*	,000065*
OPG_15	11	1,445246	1,874766	1,68272	,375066

STAT. BASIC STATS	Grouping: H3 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
EOSINO_1	1,645270	1,643747	,014103	23	,988870	14
EOSINO_2	1,814964	1,839222	-,190684	23	,850446	14
EOSINO_3	1,867395	1,754076	1,068595	23	,296340	14
EOSINO4	1,769427	1,583532	1,223527	23	,233518	14
EOSINO5	1,644960	1,622848	,154631	23	,878461	14
EOSINO6	1,672356	1,649344	,190885	23	,850291	14
EOSINO_7	1,916386	1,926853	-,068010	23	,946365	14
EOSINO_8	2,102436	1,942213	,906268	23	,374191	14
EOSINO9	1,847203	1,762074	,487128	23	,630778	14
EOSINO10	2,031057	1,851102	1,267741	23	,217575	14
EOSINO11	2,148174	2,110384	,298084	23	,768315	14
EOSINO12	2,206958	2,139298	,578569	23	,568503	14
EOSINO13	2,046506*	1,772089*	2,558964*	23*	,017546*	14*
EOSINO14	2,318622	2,159775	1,333444	23	,195443	14
EOSINO15	2,273132	2,019937	1,818430	22	,082640	13

STAT. BASIC STATS	Grouping: H3 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
EOSINO_1	11	,214016	,325027	2,306467	,159705
EOSINO_2	11	,264894	,371586	1,967763	,252038
EOSINO_3	11	,221972	,308664	1,933629	,264173
EOSINO4	11	,212527	,518010	5,940827	,003838
EOSINO5	11	,330013	,384876	1,360123	,593039
EOSINO6	11	,208899	,386234	3,418435	,041304
EOSINO_7	11	,254479	,501398	3,882035	,025030
EOSINO_8	11	,374049	,510833	1,865098	,290478
EOSINO9	11	,407823	,465279	1,301618	,644376
EOSINO10	11	,243181	,456727	3,527390	,036603
EOSINO11	11	,301412	,331073	1,206502	,736906
EOSINO12	11	,273068	,311159	1,298436	,647287
EOSINO13	11*	,229114*	,307716*	1,803835*	,316375*
EOSINO14	11	,192864	,390769	4,105217	,019900
EOSINO15	11	,334649	,346042	1,069252	,899130

STAT. BASIC STATS	Grouping: H3 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
IGE1	-1,47176	-1,50502	,208630	19	,836957	12
IGE3	-1,36346	-1,62387	1,698211	17	,107695	12
IGE5	-1,37798	-1,69781	1,912981	20	,070177	12
IGE8	-1,27115	-1,51518	1,030737	17	,317107	12
IGE10	-1,22686	-1,37142	,684474	21	,501161	13
IGE12	-1,08951	-1,32083	,821493	18	,422114	10
IGE13	-,88789	-1,26573	1,640810	19	,117287	12
IGE14	-,82307	-1,17447	1,605970	23	,121924	14
IGE15	-,68307*	-1,26026*	2,587496*	20*	,017596*	11*
TIGE1	,50280	,26537	1,259753	20	,222261	12
TIGE3	,73510*	,44896*	2,532304*	23*	,018616*	14*
TIGE5	,92346	,68402	1,291022	22	,210098	13
TIGE8	,81415	,78217	,365565	23	,718030	14
TIGE10	,82162	,83623	-,144580	22	,886359	13
TIGE12	,83986	,84458	-,034854	22	,972510	13
TIGE13	,85514	,77403	,649560	23	,522412	14
TIGE14	,89473	,63879	1,704087	23	,101840	14
TIGE15	,91696	,78796	1,251714	22	,223820	13

STAT. BASIC STATS	Grouping: H3 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
IGE1	9	,388486	,320767	1,466808	,599251
IGE3	7	,343527	,279603	1,509515	,636482
IGE5	10	,330566	,453060	1,878434	,321676
IGE8	7	,340588	,699622	4,219569	,037937
IGE10	10	,466146	,546435	1,374145	,595843
IGE12	10	,655723	,602447	1,184683	,804816
IGE13	9	,544302	,490240	1,232717	,784817
IGE14	11	,587668	,478905	1,505792	,522812
IGE15	11*	,502987*	,542544*	1,163472*	,815460*
TIGE1	10	,350943	,529208	2,273947	,199896
TIGE3	11*	,186680*	,368226*	3,890767*	,024803*
TIGE5	11	,398957	,509799	1,632852	,416761
TIGE8	11	,211662	,224098	1,120962	,830247
TIGE10	11	,244019	,250084	1,050323	,922026
TIGE12	11	,288207	,375567	1,698113	,381420
TIGE13	11	,315672	,302320	1,090279	,907882
TIGE14	11	,248405	,489271	3,879532	,025095
TIGE15	11	,261576	,239021	1,197633	,785943

STAT. BASIC STATS	Grouping: H3 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
IGG1	-,807537	-,988011	1,76930	22	,090707	13
IGG3	-,720488	-,800417	1,14977	23	,262053	14
IGG5	-,552263	-,579344	,39922	22	,693580	13
IGG8	-,413730	-,454833	,71069	23	,484420	14
IGG10	-,353277	-,358105	,07847	23	,938137	14
IGG12	-,396549	-,320823	-1,27580	23	,214760	14
IGG13	-,423122	-,407364	-,36222	23	,720497	14
IGG14	-,406567	-,374236	-,53400	23	,598463	14
IGG15	-,382868	-,379904	-,05105	22	,959750	13

STAT. BASIC STATS	Grouping: H3 (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variancs	p variancs
IGG1	11	,210379	,288577	1,881561	,298169
IGG3	11	,194386	,139093	1,953084	,293680
IGG5	11	,157874	,174384	1,220092	,733562
IGG8	11	,124899	,164649	1,737797	,347066
IGG10	11	,167393	,131213	1,627507	,445470
IGG12	11	,172415	,106160	2,637720	,131029
IGG13	11	,117356	,094396	1,545623	,496026
IGG14	11	,169378	,121001	1,959469	,291348
IGG15	11	,151606	,128939	1,382509	,616595



## ANEXO VII

COMPARAÇÃO DA MÉDIA DE OPG, EOSINÓFILOS, IGE TOTAL, IGE E IGG ESPECÍFICAS PELO TESTE T DE STUDENT ENTRE O GRUPO RESISTENTE E SUSCEPTÍVEL FORMADO PELAS SEGUINTE HIPÓTESES:

- ✓ Agrupamento HA: análise de *cluster* dos dados de IgE específica das coletas 5 (segundo pico de parasitismo), 8 (anterior ao terceiro pico de parasitismo) e 14 (quarto pico de parasitismo);
- ✓ Agrupamento HB: análise de *cluster* dos dados de IgE específica das coletas 5, 10 e 14 (relativas ao segundo, terceiro e quarto pico de parasitismo, respectivamente);
- ✓ Agrupamento HC: análise de *cluster* dos dados de IgE total das coletas 5 (segundo pico de parasitismo), 8 (anterior ao terceiro pico de parasitismo) e 14 (quarto pico de parasitismo);
- ✓ Agrupamento HD: análise de *cluster* dos dados de IgE total das coletas 5, 10 e 14 (relativas ao segundo, terceiro e quarto pico de parasitismo, respectivamente)

\* indica diferença para  $p < 0,05$

STAT. BASIC STATS	Grouping: HA (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
OPG_1	1,31879	2,50284	-1,92590	15	,073287	8
OPG_2	,75162	1,42985	-1,25893	15	,227296	8
OPG_3	,81090	2,07606	-2,09474	15	,053583	8
OPG_4	2,55433	2,76367	-,34288	15	,736446	8
OPG_5	2,71215*	3,38987*	-2,60960*	15*	,019718*	8*
OPG_6	,85899*	2,41158*	-2,78907*	14*	,014489*	7*
OPG_7	5,33643	6,15320	-1,18365	15	,254970	8
OPG_8	5,85550	6,83665	-1,06433	15	,304013	8
OPG_9	7,43908	8,33335	-2,10200	15	,052855	8
OPG_10	7,74069	8,31534	-2,00364	15	,063516	8
OPG_11	3,75995	5,18435	-1,20702	15	,246115	8
OPG_12	1,15378*	3,66600*	-2,44787*	15*	,027155*	8*
OPG_13	7,52364	7,78578	-,42818	15	,674602	8
OPG_14	6,56383	8,55869	-2,03299	15	,060145	8
OPG_15	4,89064	4,74547	,14480	15	,886795	8
EOSINO_1	1,61411	1,63517	-,17088	15	,866599	8
EOSINO_2	1,84551	1,80871	,22494	15	,825058	8
EOSINO_3	1,82828	1,79407	,28837	15	,777007	8
EOSINO4	1,53853	1,72279	-,95212	15	,356126	8
EOSINO5	1,54957	1,55670	-,04068	15	,968089	8
EOSINO6	1,57892	1,70643	-,79843	15	,437078	8
EOSINO_7	1,90108	1,92045	-,09415	15	,926237	8
EOSINO_8	2,01559	1,98661	,13680	15	,893006	8
EOSINO9	1,82846	1,85901	-,14721	15	,884925	8
EOSINO10	1,88549	1,93471	-,29360	15	,773083	8
EOSINO11	2,10990	2,14332	-,25187	15	,804559	8
EOSINO12	2,11216	2,15494	-,29811	15	,769707	8
EOSINO13	1,84475	1,83688	,05799	15	,954523	8
EOSINO14	2,23073	2,27314	-,26778	15	,792516	8
EOSINO15	2,29683	1,99809	1,67709	15	,114234	8
IGE1	-1,27001	-1,65562	2,15082	12	,052566	7
IGE3	-1,18253*	-1,68630*	2,97073*	10*	,014028*	5*
IGE5	-1,12096*	-1,93870*	6,72131*	14*	,000010*	8*
IGE8	-,94009*	-1,88930*	3,43332*	9*	,007469*	7*
IGE10	-,94239*	-1,59588*	2,87327*	14*	,012273*	7*
IGE12	-,71687*	-1,59117*	3,21481*	14*	,006234*	7*
IGE13	-,52738*	-1,63222*	6,15256*	12*	,000049*	8*
IGE14	-,32552*	-1,50797*	8,27859*	15*	,000001*	8*
IGE15	-,30111*	-1,43966*	5,67462*	13*	,000076*	6*
TIGE1	,53461*	,04059*	2,87542*	13*	,013007*	7*
TIGE3	,67353	,40405	1,77415	15	,096332	8
TIGE5	1,06364*	,39028*	3,89025*	15*	,001450*	8*
TIGE8	,78134	,69431	,86638	15	,399930	8
TIGE10	,88022	,67606	1,89768	15	,077156	8
TIGE12	,88288	,66076	1,36460	14	,193911	7
TIGE13	,96397*	,62415*	2,88886*	15*	,011246*	8*
TIGE14	1,01405*	,48790*	2,89442*	15*	,011120*	8*
TIGE15	,95727*	,64245*	3,54248*	15*	,002954*	8*
IGG1	-,89143	-,98191	,67691	15	,508766	8
IGG3	-,73124	-,84502	1,44864	15	,168020	8
IGG5	-,45199*	-,68007*	3,40879*	15*	,003887*	8*
IGG8	-,40662	-,52786	1,94709	15	,070497	8
IGG10	-,34165	-,45095	1,60907	15	,128440	8
IGG12	-,39769	-,39481	-,03690	15	,971053	8
IGG13	-,39360	-,45894	1,24001	15	,234020	8
IGG14	-,34587	-,47368	1,77334	15	,096471	8
IGG15	-,31551*	-,48522*	2,87182*	15*	,011641*	8*

STAT. BASIC STATS	Grouping: HA (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
OPG_1	9	1,438924	1,090857	1,73996	,454214
OPG_2	9	1,037335	1,167584	1,26689	,768040
OPG_3	9	1,128679	1,334945	1,39890	,671216
OPG_4	9	,560212	1,638774	8,55724	,010425
OPG_5	9*	,509578*	,555327*	1,18762*	,833557*
OPG_6	9*	1,071355*	1,128894*	1,11030*	,924469*
OPG_7	9	,908300	1,749100	3,70826	,101143
OPG_8	9	2,552716	1,023050	6,22603	,019525
OPG_9	9	1,244774	,285539	19,00429	,000433
OPG_10	9	,523908	,642680	1,50480	,603507
OPG_11	9	2,462714	2,398393	1,05436	,931055
OPG_12	9*	2,136386*	2,090600*	1,04428*	,941155*
OPG_13	9	1,358137	1,167208	1,35391	,676283
OPG_14	9	2,770855	,963393	8,27219	,007898
OPG_15	9	2,170970	1,963857	1,22205	,778020
EOSINO_1	9	,305414	,197471	2,39205	,244939
EOSINO_2	9	,254188	,394977	2,41454	,262482
EOSINO_3	9	,198991	,277686	1,94734	,395093
EOSINO4	9	,346444	,438623	1,60294	,547757
EOSINO5	9	,275969	,421488	2,33266	,281202
EOSINO6	9	,236598	,391848	2,74292	,201356
EOSINO_7	9	,261569	,525397	4,03463	,082240
EOSINO_8	9	,423979	,446087	1,10701	,906354
EOSINO9	9	,493234	,359558	1,88177	,394705
EOSINO10	9	,259673	,405232	2,43531	,257983
EOSINO11	9	,234019	,303038	1,67684	,509754
EOSINO12	9	,274503	,312349	1,29476	,746367
EOSINO13	9	,137720	,360404	6,84836	,019931
EOSINO14	9	,176391	,414688	5,52701	,036210
EOSINO15	9	,372700	,361155	1,06496	,920541
IGE1	7	,427896	,204698	4,36966	,095781
IGE3	7*	,250131*	,313173*	1,56759*	,690900*
IGE5	8*	,274021*	,208159*	1,73291*	,485361*
IGE8	4*	,519109*	,211519*	6,02308*	,169076*
IGE10	9*	,532440*	,379234*	1,97118*	,368115*
IGE12	9*	,599326*	,490155*	1,49506*	,583574*
IGE13	6*	,394649*	,217488*	3,29270*	,208145*
IGE14	9*	,379556*	,189620*	4,00666*	,070088*
IGE15	9*	,321901*	,413200*	1,64769*	,603846*
TIGE1	8*	,221871*	,403072*	3,30038*	,166965*
TIGE3	9	,380061	,238370	2,54217	,214629
TIGE5	9*	,223634*	,440632*	3,88219*	,090454*
TIGE8	9	,257301	,149030	2,98080	,148878
TIGE10	9	,191071	,244887	1,64263	,526945
TIGE12	9	,328651	,318704	1,06339	,908643
TIGE13	9*	,116492*	,313065*	7,22230*	,017116*
TIGE14	9*	,233515*	,463352*	3,93725*	,087372*
TIGE15	9*	,187891*	,178400*	1,10923*	,877880*
IGG1	9	,366344	,156406	5,48616	,028661
IGG3	9	,192780	,128333	2,25654	,276834
IGG5	9*	,128290*	,145431*	1,28507*	,753819*
IGG8	9	,088818	,154543	3,02756	,162202
IGG10	9	,133314	,145212	1,18645	,834568
IGG12	9	,154242	,166599	1,16665	,851878
IGG13	9	,115605	,101778	1,29017	,723548
IGG14	9	,122060	,167967	1,89365	,415149
IGG15	9*	,114306*	,127659*	1,24728*	,783705*

STAT. BASIC STATS	Grouping: HB (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
OPG_1	1,31879	2,46065	-1,86937	15	,081221	8
OPG_2	,75162	1,42985	-1,25893	15	,227296	8
OPG_3	,81090	1,92960	-1,92603	15	,073269	8
OPG_4	2,55433	2,57077	-,02734	15	,978546	8
OPG_5	2,71215	3,24931	-1,86749	15	,081498	8
OPG_6	,85899*	2,66749*	-4,10705*	14*	,001067*	7*
OPG_7	5,33643	6,34546	-1,43759	14	,172526	8
OPG_8	5,85550	7,04439	-1,29021	15	,216513	8
OPG_9	7,43908	8,34361	-2,13045	15	,050094	8
OPG_10	7,74069*	8,48144*	-3,03261*	15*	,008396*	8*
OPG_11	3,75995	5,18435	-1,20702	15	,246115	8
OPG_12	1,15378*	3,74247*	-2,49043*	15*	,024973*	8*
OPG_13	7,52364	7,66237	-,23478	15	,817556	8
OPG_14	6,56383	8,62505	-2,08351	15	,054725	8
OPG_15	4,89064	4,62414	,26803	15	,792330	8
EOSINO_1	1,61411	1,69130	-,60041	15	,557196	8
EOSINO_2	1,84551	1,82368	,13576	15	,893819	8
EOSINO_3	1,82828	1,76573	,46944	15	,645509	8
EOSINO4	1,53853	1,68189	-,68510	15	,503728	8
EOSINO5	1,54957	1,54281	,03843	15	,969855	8
EOSINO6	1,57892	1,69105	-,68868	15	,501541	8
EOSINO_7	1,90108	1,93668	-,17965	15	,859829	8
EOSINO_8	2,01559	1,91403	,43031	15	,673087	8
EOSINO9	1,82846	1,84278	-,06797	15	,946706	8
EOSINO10	1,88549	1,84081	,22946	15	,821612	8
EOSINO11	2,10990	2,08559	,16537	15	,870859	8
EOSINO12	2,11216	2,11873	-,04639	15	,963610	8
EOSINO13	1,84475	1,87777	-,26226	15	,796689	8
EOSINO14	2,23073	2,28994	-,39854	15	,695850	8
EOSINO15	2,29683	2,03025	1,51757	15	,149914	8
IGE1	-1,27001	-1,64941	2,11940	12	,055595	7
IGE3	-1,18253*	-1,66953*	2,91375*	10*	,015465*	5*
IGE5	-1,12096*	-1,88896*	6,44405*	14*	,000015*	8*
IGE8	-,94009*	-1,84495*	3,65216*	10*	,004446*	7*
IGE10	-,94239*	-1,70662*	4,03729*	14*	,001223*	7*
IGE12	-,71687*	-1,74672*	4,69503*	13*	,000419*	7*
IGE13	-,52738*	-1,50839*	5,13450*	12*	,000247*	8*
IGE14	-,32552*	-1,44650*	6,96420*	15*	,000005*	8*
IGE15	-,30111*	-1,32809*	4,88939*	13*	,000296*	6*
TIGE1	,53461	,13629	1,91834	13	,077296	7
TIGE3	,67353	,42321	1,61121	15	,127972	8
TIGE5	1,06364*	,43805*	3,31914*	15*	,004672*	8*
TIGE8	,78134	,68628	,96179	15	,351403	8
TIGE10	,88022	,75390	1,05435	15	,308410	8
TIGE12	,88288	,70887	,92727	14	,369499	7
TIGE13	,96397	,70921	1,92773	15	,073041	8
TIGE14	1,01405*	,56129*	2,38478*	15*	,030725*	8*
TIGE15	,95727*	,69813*	2,48287*	15*	,025348*	8*
IGG1	-,89143	-,94963	,43382	15	,670596	8
IGG3	-,73124	-,85818	1,69531	15	,110668	8
IGG5	-,45199*	-,66288*	3,01018*	15*	,008789*	8*
IGG8	-,40662	-,53204	2,02261	15	,061318	8
IGG10	-,34165	-,45854	1,75094	15	,100373	8
IGG12	-,39769	-,41212	,18991	15	,851926	8
IGG13	-,39360	-,48314	1,85964	15	,082663	8
IGG14	-,34587*	-,49056*	2,19946*	15*	,043941*	8*
IGG15	-,31551*	-,49463*	3,19168*	15*	,006066*	8*

STAT. BASIC STATS	Grouping: HB (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
OPG_1	9	1,438924	1,072961	1,79849	,428464
OPG_2	9	1,037335	1,167584	1,26689	,768040
OPG_3	9	1,128679	1,250765	1,22803	,799426
OPG_4	9	,560212	1,611377	8,27351	,011518
OPG_5	9	,509578	,655581	1,65513	,520586
OPG_6	9*	1,071355*	,689369*	2,41525*	,247409*
OPG_7	8	,908300	1,765276	3,77717	,100626
OPG_8	9	2,552716	1,020370	6,25878	,019211
OPG_9	9	1,244774	,275128	20,46967	,000329
OPG_10	9*	,523908*	,483352*	1,17485*	,818289*
OPG_11	9	2,462714	2,398393	1,05436	,931055
OPG_12	9*	2,136386*	2,141616*	1,00490*	1,000000*
OPG_13	9	1,358137	1,076548	1,59155	,527966
OPG_14	9	2,770855	1,026762	7,28262	,011933
OPG_15	9	2,170970	1,930468	1,26469	,743433
EOSINO_1	9	,305414	,222772	1,87957	,395558
EOSINO_2	9	,254188	,385804	2,30369	,288219
EOSINO_3	9	,198991	,326097	2,68552	,210643
EOSINO_4	9	,346444	,492633	2,02200	,369126
EOSINO_5	9	,275969	,422903	2,34835	,277490
EOSINO_6	9	,236598	,401941	2,88605	,180340
EOSINO_7	9	,261569	,501877	3,68149	,102929
EOSINO_8	9	,423979	,533875	1,58559	,557158
EOSINO_9	9	,493234	,373658	1,74244	,453087
EOSINO_10	9	,259673	,491962	3,58929	,109390
EOSINO_11	9	,234019	,351818	2,26014	,299181
EOSINO_12	9	,274503	,305437	1,23808	,791177
EOSINO_13	9	,137720	,330536	5,76032	,032343
EOSINO_14	9	,176391	,384806	4,75919	,053957
EOSINO_15	9	,372700	,351419	1,12478	,863369
IGE1	7	,427896	,203028	4,44185	,092411
IGE3	7*	,250131*	,306733*	1,50379*	,721885*
IGE5	8*	,274021*	,196325*	1,94812*	,398711*
IGE8	5*	,519109*	,208300*	6,21066*	,098717*
IGE10	9*	,532440*	,185160*	8,26890*	,008818*
IGE12	8*	,599326*	,160342*	13,97113*	,002780*
IGE13	6*	,394649*	,286946*	1,89157*	,500716*
IGE14	9*	,379556*	,282301*	1,80771*	,424565*
IGE15	9*	,321901*	,439694*	1,86576*	,510065*
TIGE1	8	,221871	,506681	5,21516	,061502
TIGE3	9	,380061	,255521	2,21235	,288302
TIGE5	9*	,223634*	,488202*	4,76568*	,053766*
TIGE8	9	,257301	,140196	3,36831	,110278
TIGE10	9	,191071	,286430	2,24722	,302533
TIGE12	9	,328651	,402083	1,49679	,641112
TIGE13	9	,116492	,356120	9,34541	,008014
TIGE14	9*	,233515*	,488385*	4,37417*	,067093*
TIGE15	9*	,187891*	,235825*	1,57531*	,562819*
IGG1	9	,366344	,159669	5,26426	,032394
IGG3	9	,192780	,109571	3,09550	,135931
IGG5	9*	,128290*	,156768*	1,49324*	,610503*
IGG8	9	,088818	,153727	2,99567	,166081
IGG10	9	,133314	,140857	1,11636	,897580
IGG12	9	,154242	,158156	1,05139	,960397
IGG13	9	,115605	,081959	1,98959	,355540
IGG14	9*	,122060*	,146042*	1,43156*	,649445*
IGG15	9*	,114306*	,116518*	1,03909*	,972784*

STAT. BASIC STATS	Grouping: HC (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
OPG_1	,66811*	2,46108*	-3,68123*	16*	,002021*	6*
OPG_2	,71792	1,23941	-,90782	16	,377444	6
OPG_3	,66811	1,72407	-1,63329	16	,121928	6
OPG_4	2,69062	2,50183	,27770	16	,784800	6
OPG_5	2,92589	3,19087	-1,04146	16	,313145	6
OPG_6	1,67027	2,15532	-,85365	15	,406728	6
OPG_7	4,02793*	5,96775*	-2,19597*	16*	,043183*	6*
OPG_8	6,71283	6,01158	,76355	16	,456250	6
OPG_9	7,36954	7,97958	-1,22731	16	,237460	6
OPG_10	7,95203	8,16970	-,74669	15	,466791	6
OPG_11	3,47489	4,27285	-,55853	16	,584213	6
OPG_12	,76919*	3,13410*	-2,15466*	16*	,046770*	6*
OPG_13	8,09842	7,63447	,81407	16	,427557	6
OPG_14	6,80047	8,07635	-1,14474	16	,269153	6
OPG_15	5,31963	4,51066	,83014	16	,418675	6
EOSINO_1	1,53296	1,65708	-,96034	16	,351175	6
EOSINO_2	1,76044	1,81010	-,28300	16	,780806	6
EOSINO_3	1,81369	1,82280	-,07609	16	,940291	6
EOSINO4	1,63148	1,70002	-,33159	16	,744499	6
EOSINO5	1,67894	1,58586	,52346	16	,607827	6
EOSINO6	1,67184	1,66674	,02951	16	,976821	6
EOSINO_7	1,95122	1,94162	,04552	16	,964259	6
EOSINO_8	2,03981	2,06180	-,11151	16	,912596	6
EOSINO9	1,60798	1,88698	-1,56214	16	,137815	6
EOSINO10	1,95051	1,97220	-,11663	16	,908602	6
EOSINO11	1,96117	2,14844	-1,31009	16	,208664	6
EOSINO12	2,10668	2,16290	-,38350	16	,706399	6
EOSINO13	1,88540	1,89634	-,06695	16	,947448	6
EOSINO14	2,19555	2,27048	-,46952	16	,645032	6
EOSINO15	2,11889	2,10743	,05569	15	,956320	6
IGE1	-1,37143	-1,53462	,80564	12	,436127	5
IGE3	-1,18679*	-1,66069*	2,82854*	10*	,017897*	4*
IGE5	-1,16966*	-1,73768*	2,64412*	14*	,019249*	5*
IGE8	-1,16638	-1,46184	,93751	11	,368625	6
IGE10	-,91040	-1,48518	2,12443	14	,051928	5
IGE12	-,90787	-1,39619	1,53423	15	,145792	5
IGE13	-,91918	-1,19124	,77130	12	,455449	5
IGE14	-,82791	-1,18179	1,19493	16	,249528	6
IGE15	-,61212*	-1,29539*	2,22512*	13*	,044398*	5*
TIGE1	,73036*	,10637*	3,33490*	13*	,005374*	5*
TIGE3	,77412	,45803	1,92859	16	,071718	6
TIGE5	1,23780*	,47131*	4,10084*	15*	,000945*	5*
TIGE8	1,05806*	,67331*	5,23538*	16*	,000082*	6*
TIGE10	1,02856*	,70921*	2,79781*	15*	,013519*	6*
TIGE12	1,01657	,69161	1,99596	15	,064425	6
TIGE13	,96197	,70619	1,58697	16	,132083	6
TIGE14	1,03959*	,60045*	2,14646*	16*	,047514*	6*
TIGE15	1,10011*	,69940*	3,63676*	15*	,002435*	6*
IGG1	-,86574	-,95308	,57904	15	,571153	6
IGG3	-,65003*	-,84636*	2,52979*	16*	,022295*	6*
IGG5	-,40402*	-,65289*	3,58147*	15*	,002727*	5*
IGG8	-,30796*	-,48945*	2,65350*	16*	,017345*	6*
IGG10	-,22629*	-,41636*	2,55766*	16*	,021074*	6*
IGG12	-,22801*	-,40638*	2,45764*	16*	,025776*	6*
IGG13	-,32278*	-,44753*	2,75203*	16*	,014175*	6*
IGG14	-,30797	-,44838	1,84659	16	,083388	6
IGG15	-,26125*	-,45205*	2,96156*	15*	,009703*	6*

STAT. BASIC STATS	Grouping: HC (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
OPG_1	12*	1,035027*	,945132*	1,19927*	,741515*
OPG_2	12	1,116205	1,163451	1,08645	,993872
OPG_3	12	1,035027	1,394634	1,81559	,529499
OPG_4	12	,460585	1,610155	12,22125	,012561
OPG_5	12	,212419	,596767	7,89262	,033581
OPG_6	11	,818261	1,243159	2,30818	,368498
OPG_7	12*	2,021041*	1,638106*	1,52218*	,520801*
OPG_8	12	,527870	2,186513	17,15736	,005704
OPG_9	12	1,155897	,911123	1,60947	,473954
OPG_10	11	,299719	,670777	5,00874	,089300
OPG_11	12	2,846209	2,862412	1,01142	1,000000
OPG_12	12*	1,884115*	2,322807*	1,51989*	,675036*
OPG_13	12	,835806	1,253904	2,25070	,382254
OPG_14	12	3,381842	1,424446	5,63657	,016216
OPG_15	12	,873364	2,275646	6,78921	,046571
EOSINO_1	12	,377510	,180030	4,39712	,038204
EOSINO_2	12	,286973	,376500	1,72127	,571033
EOSINO_3	12	,213478	,250380	1,37560	,764887
EOSINO_4	12	,424648	,408171	1,08237	,843212
EOSINO_5	12	,325792	,368380	1,27853	,833866
EOSINO_6	12	,280544	,371490	1,75344	,556399
EOSINO_7	12	,342437	,453187	1,75143	,557299
EOSINO_8	12	,324254	,422580	1,69843	,581729
EOSINO_9	12	,433450	,316532	1,87518	,357507
EOSINO_10	12	,380933	,367590	1,07392	,851068
EOSINO_11	12	,277563	,289598	1,08860	,991887
EOSINO_12	12	,294394	,292600	1,01230	,910471
EOSINO_13	12	,226146	,363541	2,58422	,304669
EOSINO_14	12	,187958	,363486	3,73985	,156680
EOSINO_15	11	,295713	,450097	2,31670	,366333
IGE1	9	,335936	,376025	1,25291	,882417
IGE3	8*	,202793*	,298847*	2,17166*	,562804*
IGE5	11*	,333339*	,421482*	1,59877*	,689885*
IGE8	7	,567925	,565260	1,00945	,970496
IGE10	11	,450378	,520714	1,33673	,837625
IGE12	12	,462464	,640158	1,91610	,556232
IGE13	9	,393215	,722890	3,37975	,254546
IGE14	12	,445160	,648239	2,12050	,419832
IGE15	10*	,460124*	,599915*	1,69992*	,640828*
TIGE1	10*	,225210*	,382126*	2,87897*	,320915*
TIGE3	12	,469162	,237148	3,91387	,055386
TIGE5	12*	,111143*	,404533*	13,24778*	,023541*
TIGE8	12*	,140943*	,149641*	1,12724*	,957076*
TIGE10	11*	,196251*	,237937*	1,46995*	,702690*
TIGE12	11	,335707	,313073	1,14981	,792654
TIGE13	12	,354854	,306423	1,34109	,634521
TIGE14	12*	,317597*	,444600*	1,95968*	,473433*
TIGE15	11*	,241576*	,203766*	1,40554*	,603716*
IGG1	11	,448408	,178819	6,28809	,013717
IGG3	12*	,183909*	,140238*	1,71978*	,421193*
IGG5	12*	,106418*	,138278*	1,68840*	,649128*
IGG8	12*	,099375*	,150754*	2,30136*	,368863*
IGG10	12*	,127121*	,157433*	1,53378*	,667112*
IGG12	12*	,109375*	,158771*	2,10720*	,423947*
IGG13	12*	,054002*	,103102*	3,64514*	,164485*
IGG14	12	,131642	,160494	1,48638	,694656
IGG15	11*	,054934*	,150541*	7,50982*	,038108*

STAT. BASIC STATS	Grouping: HD (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2					
Variable	Mean G_1:1	Mean G_2:2	t-value	df	p	Valid N G_1:1
OPG_1	1,56805*	2,71933*	-2,62274*	15*	,019209*	6*
OPG_2	1,33657	1,19686	,23730	15	,815638	6
OPG_3	1,41526	1,62059	-,28730	14	,778089	6
OPG_4	2,62408	2,72702	-,16135	15	,873969	6
OPG_5	2,93924	3,15569	-,78154	15	,446647	6
OPG_6	1,87848	1,91246	-,05974	14	,953205	6
OPG_7	5,34070	5,01646	,30167	14	,767338	5
OPG_8	7,01771	5,75513	1,37979	15	,187872	6
OPG_9	7,57324	7,84350	-,59117	15	,563207	6
OPG_10	8,20086	7,94950	,84626	14	,411641	6
OPG_11	3,83962	3,98023	-,09364	15	,926636	6
OPG_12	2,42226	2,57990	-,12219	15	,904368	6
OPG_13	8,16593	7,44867	1,30346	15	,212071	6
OPG_14	7,00236	7,49999	-,40516	15	,691079	6
OPG_15	4,88203	4,43860	,44275	15	,664265	6
EOSINO_1	1,73366	1,62149	,94581	15	,359235	6
EOSINO_2	1,85032	1,74962	,58536	15	,567007	6
EOSINO_3	1,69165	1,80188	-,84167	15	,413193	6
EOSINO4	1,66079	1,63465	,15154	15	,881567	6
EOSINO5	1,55610	1,56750	-,06465	15	,949304	6
EOSINO6	1,68686	1,62863	,34698	15	,733428	6
EOSINO_7	1,97468	1,84891	,60992	15	,551042	6
EOSINO_8	1,99667	2,04825	-,22270	15	,826771	6
EOSINO9	1,62880*	1,94234*	-2,27552*	15*	,037977*	6*
EOSINO10	1,91403	1,99676	-,40421	15	,691764	6
EOSINO11	1,86915	2,13593	-1,94387	15	,070914	6
EOSINO12	2,12991	2,12926	,00475	15	,996270	6
EOSINO13	1,92296	1,93121	-,04840	15	,962040	6
EOSINO14	2,12159	2,29334	-,98792	15	,338860	6
EOSINO15	2,15337	2,07327	,39021	14	,702257	6
IGE1	-1,44846	-1,55243	,50515	11	,623424	4
IGE3	-1,28397*	-1,68876*	2,27942*	10*	,045831*	4*
IGE5	-1,33848	-1,69995	1,48555	14	,159567	5
IGE8	-1,30230	-1,37793	,22855	11	,823413	6
IGE10	-1,16444	-1,45588	,99099	14	,338508	6
IGE12	-,97926	-1,31354	,82586	12	,424996	4
IGE13	-1,10092	-1,15700	,15341	12	,880626	5
IGE14	-,93471	-1,13266	,63335	15	,536043	6
IGE15	-,68316	-1,23138	1,60905	12	,133582	5
TIGE1	,88854*	,05620*	4,31680*	12*	,001002*	4*
TIGE3	,85932*	,47005*	2,90329*	15*	,010922*	6*
TIGE5	,98124*	,48634*	2,15883*	14*	,048709*	5*
TIGE8	,90957	,71249	2,05038	15	,058227	6
TIGE10	1,04239*	,75144*	2,21688*	14*	,043694*	6*
TIGE12	1,08813	,74075	1,93348	14	,073658	6
TIGE13	,96410	,71059	1,41362	15	,177889	6
TIGE14	1,08857	,64645	2,11260	15	,051811	6
TIGE15	1,12210*	,74707*	3,00823*	14*	,009397*	6*
IGG1	-,89432	-,97529	,52821	14	,605623	6
IGG3	-,69441	-,84080	1,84375	15	,085065	6
IGG5	-,52641	-,63807	1,34402	14	,200319	5
IGG8	-,39599	-,46270	,84362	15	,412135	6
IGG10	-,29075	-,38563	1,08977	15	,293015	6
IGG12	-,27305	-,39430	1,50400	15	,153344	6
IGG13	-,38404	-,43290	,89583	15	,384495	6
IGG14	-,37345	-,41286	,47969	15	,638370	6
IGG15	-,36441	-,42092	,73025	14	,477278	6



STAT. BASIC STATS	Grouping: HD (cordeiros log.sta) Group 1: G_1:1 Group 2: G_2:2				
Variable	Valid N G_2:2	Std.Dev. G_1:1	Std.Dev. G_2:2	F-ratio variances	p variances
OPG_1	11*	1,253803*	,579738*	4,67730*	,036808*
OPG_2	11	1,052296	1,210401	1,32307	,798118
OPG_3	10	1,111532	1,514382	1,85621	,513467
OPG_4	11	,640501	1,471391	5,27736	,080286
OPG_5	11	,391731	,608234	2,41083	,343529
OPG_6	10	,991452	1,157734	1,36356	,766923
OPG_7	11	1,622446	2,122880	1,71203	,637168
OPG_8	11	,673908	2,156169	10,23681	,019192
OPG_9	11	,866955	,917224	1,11933	,958440
OPG_10	10	,517677	,604768	1,36477	,766122
OPG_11	11	3,145979	2,860711	1,20938	,743750
OPG_12	11	2,665323	2,478043	1,15686	,786701
OPG_13	11	,625046	1,252224	4,01366	,138360
OPG_14	11	3,532345	1,595721	4,90018	,031737
OPG_15	11	,653804	2,372316	13,16589	,010811
EOSINO_1	11	,307650	,185966	2,73684	,164782
EOSINO_2	11	,348014	,334365	1,08331	,851082
EOSINO_3	11	,324938	,217013	2,24198	,259690
EOSINO4	11	,355951	,331619	1,15213	,790690
EOSINO5	11	,289928	,372711	1,65259	,603373
EOSINO6	11	,250487	,364192	2,11393	,422915
EOSINO_7	11	,388441	,414947	1,14113	,939561
EOSINO_8	11	,484350	,441626	1,20284	,748965
EOSINO9	11*	,200854*	,300656*	2,24068*	,386273*
EOSINO10	11	,443797	,381396	1,35399	,637581
EOSINO11	11	,298484	,255228	1,36769	,628388
EOSINO12	11	,227027	,287975	1,60900	,625335
EOSINO13	11	,162620	,395172	5,90505	,063626
EOSINO14	11	,267285	,374556	1,96374	,472647
EOSINO15	10	,265501	,454565	2,93130	,248909
IGE1	9	,246385	,372232	2,28243	,536187
IGE3	8*	,341564*	,264837*	1,66337*	,520887*
IGE5	11	,513236	,423761	1,46687	,566456
IGE8	7	,701135	,488855	2,05704	,405555
IGE10	10	,637106	,528220	1,45477	,588234
IGE12	10	,714408	,673814	1,12412	,779519
IGE13	9	,565581	,695971	1,51423	,726922
IGE14	11	,488150	,670584	1,88712	,501052
IGE15	9	,575248	,627880	1,19136	,925495
TIGE1	10*	,075976*	,373771*	24,20259*	,023885*
TIGE3	11*	,287560*	,251685*	1,30539*	,671372*
TIGE5	11*	,511001*	,385303*	1,75889*	,427243*
TIGE8	11	,221661	,170978	1,68072	,453044
TIGE10	10*	,262200*	,249566*	1,10381*	,843291*
TIGE12	10	,398624	,316263	1,58866	,514286
TIGE13	11	,416412	,317155	1,72387	,433432
TIGE14	11	,268929	,467860	3,02661	,233293
TIGE15	10*	,249787*	,236638*	1,11422*	,834240*
IGG1	10	,437192	,175660	6,19436	,018608
IGG3	11	,208799	,122125	2,92313	,140037
IGG5	11	,199675	,131407	2,30893	,258258
IGG8	11	,168207	,149218	1,27071	,696633
IGG10	11	,197256	,157116	1,57623	,504747
IGG12	11	,140936	,167080	1,40541	,742743
IGG13	11	,120586	,100255	1,44671	,578055
IGG14	11	,154470	,165435	1,14701	,934544
IGG15	10	,152202	,148553	1,04972	,891905